
ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR LA SPERMOTOXINE

PAR S. METALNIKOFF

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

La spermotoxine est un de ces poisons cellulaires (cyto-toxines) qui se développent dans le sang de l'animal après injection des éléments cellulaires correspondants.

Ainsi des injections sous-cutanées ou intra-péritonéales de sang de lapin au cobaye produisent, dans le sang de ce dernier, une toxine spécifique qui dissout les globules rouges du lapin.

On a obtenu par le même procédé des sérums toxiques pour les spermatozoïdes, pour l'épithélium vibratile, pour les leucocytes, etc.

Tous ces sérums sont strictement spécifiques; ainsi la spermotoxine n'est guère toxique pour les autres éléments cellulaires.

Nous croyons pouvoir ne pas nous arrêter sur l'histoire de la question, qu'on peut trouver exposé dans les travaux récents de MM. Metchnikoff, Bordet, Ehrlich et Morgenroth.

Il suffit de noter que tous les sérums toxiques agissent par deux substances qu'ils contiennent : 1^o par l'alexine, présente dans le sérum de l'animal neuf, et 2^o par la substance sensibilisatrice (ou intermédiaire d'Ehrlich), qui se développe dans le sérum des animaux injectés par les éléments cellulaires

correspondants. Ce n'est qu'en présence de ces deux substances que le sérum est actif.

I

SPERMOTOXINE

C'est en 1899 que Landsteiner¹ découvrit la spermotoxine en injectant des spermatozoïdes du taureau au lapin. En même temps, Metchnikoff découvrit le sérum spermotoxique de l'homme et du lapin. Enfin, au commencement de cette année parut une étude intéressante de Moxter², qui obtint un sérum spermotoxique par l'injection de spermatozoïdes du mouton au lapin.

De mon côté j'ai préparé un sérum toxique pour les spermatozoïdes du cobaye.

Dans mes expériences, j'ai employé les testicules et l'épididyme du cobaye; je les broyais dans une petite quantité d'eau physiologique; je faisais passer cette émulsion à travers une toile métallique.

Après deux ou trois injections, le sérum du lapin avait acquis des nouvelles propriétés assez compliquées, et que je ne pus démêler de prime abord, parce que le sérum du lapin neuf est plus ou moins toxique pour les spermatozoïdes du cobaye. Ceux-ci, introduits dans le sérum de lapin en proportion de 1 pour 10 (1 goutte de sperme sur 10 gouttes de sérum) meurent généralement en 4-5 minutes.

Le sérum des lapins qui avaient été injectés avec le sperme de cobaye tue les spermatozoïdes en 3-4 minutes. La différence est donc si insignifiante qu'il est impossible de distinguer le sérum du lapin neuf de celui du lapin traité. Mais il suffit de chauffer les deux à 56° pour que la différence entre eux saute aux yeux. Le sérum du lapin neuf, chauffé à cette température, perd ses propriétés toxiques, qui ne peuvent réapparaître sous aucune condition; par contre, le sérum du lapin traité, chauffé à 56°, redevient toxique quand on y ajoute du sérum de cobaye (ce sérum n'est pas du tout toxique pour les spermatozoïdes du cobaye lui-même).

Ainsi, bien que la toxicité des deux sérums, de celui du

1. *Centr. f., Bacter.* 1899.

2. *Deutsch. med. Wochen.*, 1900, n° 4.

lapin neuf et du lapin traité, soit presque égale, néanmoins la différence entre ces sérums est très accentuée : le premier ne contient pas de substance sensibilisatrice (ou *Immunkörper*) et ne peut être reconstitué par l'addition de l'alexine, tandis que le second sérum contient la substance sensibilisatrice, et sa toxicité peut être facilement restituée.

Il est évident que le sérum du lapin neuf est toxique grâce à l'alexine qu'il contient.

Le sérum du lapin traité contient, en plus de l'alexine, encore une nouvelle substance, commune à toutes les cytotoxines : la substance sensibilisatrice.

Mais celle-ci ne peut agir qu'en présence de l'alexine qui se trouve aussi dans le sérum du cobaye neuf.

Dans quelles proportions ces deux substances communiquent-elles au sérum sa plus grande toxicité?

Afin de résoudre cette question, je prenais d'un côté le sérum d'un lapin traité, sérum chauffé à 56° et ne contenant par suite que la substance sensibilisatrice seule, et de l'autre côté le sérum de cobaye, sérum contenant l'alexine seule. Je prenais différentes quantités des deux, et je les mélangeais en ajoutant une quantité donnée de spermatozoïdes de cobaye.

Je définissais le degré de toxicité par le laps de temps écoulé avant que tous les spermatozoïdes du mélange soient tués.

Le tableau suivant fait voir les proportions dans lesquelles agissent les substances sensibilisatrices et l'alexine combinées, et le temps qu'elles prennent pour tuer les spermatozoïdes.

Lorsque le sérum spermotoxique, chauffé à 56°, du lapin traité, et le sérum du cobaye neuf sont mélangés dans la proportion de

	les spermatozoïdes meurent en 40 minutes.		
40 à 1	—	—	16 —
8 à 2	—	—	10 —
6 à 4	—	—	9 à 10 min.
5 à 5	—	—	7 à 8 min.
4 à 6	—	—	5 à 6 min.
2 à 8	—	—	5 à 5 m. 1/2.
4 à 10	—	—	5 à 5 m. 1/2.
4 à 12	—	—	5 minutes.
4 à 15	—	—	5 —
4 à 20	—	—	3 1/2 à 6 m.
1 à 25	—	—	9 à 10 min.
1 à 30	—	—	10 minutes.
1 à 40	—	—	

Ainsi l'optimum de l'action du sérum est atteint quand la substance sensibilisatrice est à l'alexine en proportion de $1/13$, $1/20$. Dans certains cas j'ai observé l'optimum entre $1/10$ et $1/20$, dans d'autres entre $1/15$ et $1/25$.

Tous ces chiffres n'ont évidemment qu'une valeur approximative, car nous ne pouvons obtenir ni l'alexine ni la substance sensibilisatrice à l'état de pureté. Nous n'avons que des sérums contenant ces substances en différentes quantités.

Il est donc indispensable d'employer des sérums à propriétés plus ou moins fixes.

J'employais d'un côté le sérum du lapin injecté 3 fois en 15 jours, et de l'autre du sérum frais de cobaye neuf.

Dans ces conditions, j'obtenais constamment des chiffres plus ou moins semblables. Ainsi il fallait toujours employer l'alexine en quantité 10, 15 et 20 fois plus grande que la substance sensibilisatrice pour avoir l'effet maximum.

Si la quantité d'alexine joue un si grand rôle dans l'action toxique des sérums ordinaires, et probablement des sérums bactéricides, on se demande involontairement si ces alexines sont toujours en quantité suffisante dans l'organisme, et si leur quantité ne change pas sous l'influence de différentes conditions?

Je suis tombé par hasard sur un animal qui m'a prouvé que les alexines pouvaient non seulement varier dans leur quantité, mais qu'elles pouvaient faire complètement défaut dans le sang.

J'injectai deux fois des spermatozoïdes à un lapin n° 3. L'opération fut mal faite, car il eut un énorme abcès, de la grosseur d'une pomme, qui perça en donnant une grande quantité de pus. Après quoi l'animal se rétablit promptement, et je lui fis encore deux injections de spermatozoïdes. Je retirai un peu de sang pour en préparer du sérum.

Quel fut mon étonnement quand je dus constater que le sérum de ce lapin n'était pas du tout toxique pour les spermatozoïdes du cobaye, tandis que même le sérum d'un lapin neuf l'est d'une façon très prononcée! Mais il a suffi d'ajouter un peu de sérum de cobaye neuf pour rendre très toxique celui du lapin en question.

Il est donc évident que le sérum de ce lapin ne contenait que la substance sensibilisatrice et pas d'alexine.

Ce lapin est encore vivant, et j'ai étudié plusieurs fois son

sérum. J'ai observé que la quantité d'alexines y augmentait peu à peu, et qu'il devenait de plus en plus toxique, bien que les injections de spermatozoïdes ne fussent plus renouvelées.

Au commencement de cette année, Moxter publia un mémoire dans lequel il se prononce contre la spécificité des cytotoxines.

Il tire cette conclusion : 1° de ce fait, que le sérum du lapin, ayant reçu une injection d'épididyme de mouton, acquiert, à côté de la propriété spermotoxique, un pouvoir hémolytique ; 2° du fait que le sérum perd non seulement sa propriété spermotoxique, mais aussi son pouvoir hémolytique quand on ajoute une quantité suffisante de spermatozoïdes. Il conclut donc que c'est la même substance qui dissout les globules rouges du mouton et tue ses spermatozoïdes.

Dans son dernier mémoire, Metchnikoff ¹ a prouvé que l'opinion de Moxter est erronée. De mon côté j'ai fait plusieurs expériences qui aboutissent au même résultat.

Si on injecte au lapin un mélange de spermatozoïdes et de sang défibriné de cobaye, le sérum de ce lapin devient très spermotoxique et hémolytique en même temps.

Je chauffai ce sérum et le divisai en deux parties. L'une fut gardée avec une grande quantité de globules rouges pendant 2 heures à 37°, et l'autre fut additionnée d'une grande quantité de spermatozoïdes, et gardée de même pendant 2 heures à 37°.

Les deux portions furent centrifugées et j'examinai leur action.

Le sérum n° 1, saturé de globules sanguins, ne dissolvait plus les globules rouges quand on ajoutait de l'alexine (sérum du cobaye neuf). Ainsi toute la substance sensibilisatrice de l'hémotoxine était fixée ; néanmoins ce sérum continuait d'immobiliser les spermatozoïdes aussi vite qu'avant sa saturation par les globules rouges (expérience 3).

Il est donc évident que la substance sensibilisatrice de la spermotoxine était restée intacte dans le sérum, sans être fixée par les globules rouges.

Le sérum n° 2, saturé de spermatozoïdes, présente une action quelque peu différente.

Tandis que celui du lapin traité dissout les globules rouges

1. *Annales de l'Inst. Pasteur*, 1900, n° 6.

en 4-5 minutes (expérience 2) — le sérum n° 2, saturé de spermatozoïdes — ne les dissout qu'après 1 1/2, 2 et même après 3 heures (expérience 5). Les spermatozoïdes avaient donc fixé non seulement la substance sensibilisatrice de la spermotoxine, mais aussi celle de l'hémotoxine.

Donc, tandis que les globules rouges fixent la substance sensibilisatrice de l'hémotoxine seule, — les spermatozoïdes fixent les deux substances sensibilisatrices.

C'est justement ce fait qui amena Moxter à cette conclusion erronée que les deux toxines ont une même substance sensibilisatrice.

Pour être plus bref, je vais désigner le sérum chauffé à 56° et saturé par le sang de cobaye par — sér. n° 1 ch. 56° — et le sérum saturé par les spermatozoïdes — sér. n° 2 chauff. 56°.

Expérience n° 1....	4 gouttes de sérum n° 1, chauffé à 56°. 6 gouttes de sérum de cobaye neuf. 1 goutte de sang de cobaye.	} Ne dissout pas les globules de sang du cobaye.
— 2....	4 gouttes de sérum spermotoxique et hémol. du lapin, chauffé à 56°. 6 gouttes de sérum de cobaye neuf. 1 goutte de sang de cobaye.	
— 3....	4 gouttes de sérum n° 1, chauffé à 56°. 6 gouttes de sérum de cobaye neuf. 1 goutte de spermatozoïdes de cobaye.	
— 4....	4 gouttes de sérum spermotoxique et hémol. du lapin, chauffé à 56°. 6 gouttes de sérum de cobaye neuf. 1 goutte de spermatozoïdes du cobaye.	} Tue les spermatozoïdes en 4 min.
— 5....	4 gouttes de sérum n° 2, chauffé à 56°. 6 gouttes de sérum de cobaye neuf. 1 goutte de sang de cobaye.	

Les dissout en 4 à 5 minutes.

Tue en 4 minutes.

Dissout après 1 h. 1/2.

III

ANTISPERMOTOXINE

C'est Metchnikoff qui obtint le premier l'antispermotoxine¹ en injectant le sérum spermotoxique du cobaye au lapin.

Après trois injections, le sérum du lapin neutralisait le sérum spermotoxique du cobaye en proportion de 8 : 1 et même de 2 : 1.

Dans mes expériences, j'ai procédé à l'inverse : j'injectais le sérum spermotoxique du lapin sous la peau ou dans le péritoine des cobayes (mâles, femelles et châtrés). Après 3, 4, 5 et 10 injections, je prenais le sang du cobaye ainsi traité pour étudier ses propriétés antitoxiques.

Deux cobayes seulement (un mâle et un châtré) me fournirent après trois injections un sérum neutralisant à un très faible degré le sérum spermotoxique du lapin. J'obtenais une neutralisation en ajoutant 20-25 volumes de sérum antispermotoxique pour une partie de spermotoxine. Je continuai donc les injections de sérum spermotoxique dans l'espoir d'obtenir un sérum antispermotoxique plus actif. Mais au lieu d'un renforcement, j'obtins la disparition complète de l'antispermotoxine.

Après 5 injections, le sang des cobayes ne présentait plus de pouvoir antispermotoxique, même dans les proportions de 1/25 ou 1/30. D'autres cobayes, ayant subi plusieurs injections de spermotoxines, ne fournirent plus du tout d'antispermotoxine.

On sait que les sérums toxiques contiennent, à côté des alexines, des substances sensibilisatrices spécifiques. Donc, pour obtenir une neutralisation complète du sérum toxique, il faut qu'il y ait à côté de la substance neutralisant l'alexine, l'antialexine, une autre substance neutralisant la substance sensibilisatrice, c'est-à-dire une substance antisensibilisatrice.

Il était possible que mon sérum ne produisit que l'antialexine, ce qui n'est pas suffisant pour une neutralisation complète du sérum spermotoxique.

En effet, si l'antialexine neutralise l'alexine du sérum spermotoxique, et si la substance sensibilisatrice reste libre, le sérum ne doit pas perdre son pouvoir toxique, car sa substance sensibilisatrice se combine avec l'alexine du cobaye.

1. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1900, n° 1.

Si se raisonnement est juste, le sérum antitoxique de mes cobayes, chauffé à 56°, c'est-à-dire débarrassé de l'alexine, devrait neutraliser la spermotoxine.

L'expérience a pleinement confirmé cette supposition.

Les sérums des cobayes inoculés plusieurs fois avec de la spermotoxine, ces mêmes sérums qui n'avaient eu aucune action neutralisante, neutralisaient très bien après un chauffage à 56° dans la proportion de 1/3 et de 1/5 :

1 goutte de sérum spermotoxique du lapin.	} Tue en 2 min. 1/2.
10 gouttes de sérum antitoxique de cobaye.	

1 goutte de sérum spermotoxique du lapin.	} Ne tue pas les spermatozoïdes.
10 gouttes de sérum antitoxique du cobaye, chauffé à 56°.	

Il est donc évident qu'il ne s'était produit dans le sang de mes cobayes que de l'antialexine ; celle-ci neutralisait l'alexine seule du sérum spermotoxique, sans attaquer la substance sensibilisatrice.

L'expérience suivante le démontre particulièrement :

1 goutte de sérum spermotoxique.	} Tue les spermatozoïdes en 10 minutes.
10 gouttes de sérum antitoxique du cobaye, chauffé à 56°.	
3 gouttes de sérum de cobaye neuf.	

1 goutte de sérum spermotoxique.	} Ne tue pas.
10 gouttes de sérum antitoxique, chauffé à 56°.	
3 gouttes de sérum de cobaye neuf, chauffé à 56°.	

Dix gouttes de sérum antitoxique chauffé à 56°, ajoutés à une goutte de sérum spermotoxique, neutralisent complètement toute l'alexine. Les spermatozoïdes introduits dans ce mélange restent mobiles pendant très longtemps. Mais si l'on ajoute à ce mélange quelques gouttes de sérum d'un cobaye neuf, c'est-à-dire une quantité suffisante d'alexine, les spermatozoïdes sont aussitôt immobilisés. Donc, la substance sensibilisatrice était à l'état libre.

Ainsi, en faisant agir le sérum antitoxique chauffé ou non chauffé, nous pouvons toujours définir si nous avons affaire avec l'antialexine ou avec la substance antisensibilisatrice.

Presque tous mes cobayes ayant reçu de la spermotoxine fournirent du sérum ne contenant que de l'antialexine ; deux

seulement fournirent une très petite quantité de substance antisensibilisatrice.

Bordet a indiqué ce fait dans son dernier mémoire¹ : « On constate par de telles expériences que la fonction antisensibilisatrice de notre antitoxine est peu développée; il faut en effet, en moyenne, quinze parties d'antitoxine pour neutraliser la sensibilisatrice contenue dans une partie de sérum hémolytique qui a été chauffé à 55°. Bien plus remarquable est l'intensité de la fonction antialexique de l'antitoxine. »

Comment expliquer tout de même ce fait que les animaux auxquels on a injecté des toxines produisent des antialexines en grande quantité, et ne produisent que très peu ou même point de substance antisensibilisatrice?

Il me semble que la cause de ceci réside en ce que la substance sensibilisatrice a la propriété de se fixer sur les éléments cellulaires correspondants. En effet, nous avons vu plus haut que la sensibilisatrice du sérum hémolytique se fixe non seulement sur les globules rouges, mais aussi sur les spermatozoïdes.

En se fixant sur les éléments cellulaires, la substance sensibilisatrice par cela même est éliminée du sang; il est cependant probable que les éléments du sang, les phagocytes, jouent un rôle dans l'élaboration des antitoxines. Pour obtenir une substance antisensibilisatrice, il faudrait avoir une très grande quantité de substance sensibilisatrice, il faudrait que tous les éléments cellulaires correspondants en soient saturés et qu'il en reste encore dans le sang.

IV

AUTOSPERMATOXINE

On croyait jusqu'ici que, pour obtenir des cytotoxines, il fallait injecter les éléments cellulaires d'une espèce animale à une autre espèce. Ainsi, afin d'obtenir une hémotoxine pour le lapin, il faut injecter ses globules sanguins à un animal d'autre espèce, par exemple à un cobaye ou à un chien, mais en aucun cas au lapin lui-même.

Pourtant MM. Ehrlich et Morgenroth² ont démontré tout dernièrement qu'il n'en était pas tout à fait ainsi. Ils injectèrent

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1900, n° 5.

2. *Bert. kl. Woch.*, 1900, n° 21.

à une chèvre du sang (dilué dans de l'eau) d'une autre chèvre, et obtinrent un sérum toxique pour beaucoup d'animaux de la même espèce. Ainsi la chèvre peut fournir du sérum hémotoxique pour une autre chèvre (isotoxine), mais ne peut en produire pour ses propres éléments cellulaires (autotoxine).

S'il en est ainsi pour les globules sanguins rouges, il n'en est guère de même pour les spermatozoïdes, car on obtient très facilement leurs autotoxines. Quand on injecte les spermatozoïdes d'un cobaye sous la peau ou dans le péritoine d'un autre cobaye, on remarque que, déjà après la première injection, le sérum du cobaye inoculé devient faiblement toxique, non seulement pour les spermatozoïdes d'autres cobayes, mais aussi pour ceux du cobaye inoculé lui-même.

L'autotoxicité augmente beaucoup après la 2^e et 3^e injection. En ajoutant 10 gouttes de sérum à une goutte de spermatozoïdes, on les immobilise en 3-4 minutes.

Cette autotoxine est soumise aux lois générales des cytotoxines. Elle perd ses propriétés toxiques étant chauffée à 55°, et les réacquiert facilement après l'addition du sérum d'un cobaye neuf.

J'ai injecté des mâles, des femelles et des cobayes châtrés; tous produisaient un sérum autotoxique, actif à peu près au même degré.

Ce qui est très curieux, c'est que le cobaye, dont le sang contient des toxines très actives pour ses propres spermatozoïdes *in vitro*, présente lui-même des spermatozoïdes aussi mobiles et vivants que le cobaye neuf. Introduits dans de l'eau physiologique, ils y vivent très longtemps.

Pourtant si l'on introduit ces spermatozoïdes dans le sérum d'un cobaye neuf, ils meurent très vite (en 10-20 minutes), tandis que les spermatozoïdes du cobaye neuf vivent dans le sérum normal du cobaye pendant quelques heures.

Il est évident que les spermatozoïdes étaient sensibilisés par la substance sensibilisatrice circulant dans le sang du cobaye. Donc si les spermatozoïdes n'étaient pas tués par les autotoxines, c'était dû exclusivement à ce que le sang ne contenait pas d'alexine libre, celle-ci étant renfermée dans l'intérieur des phagocytes, d'après l'opinion émise plusieurs fois par Metchnikoff.

Cela explique facilement pourquoi les autotoxines sont actives *in vitro* et ne le sont pas dans l'organisme.

Les éléments cellulaires sont détruits dans le sérum *in vitro*; c'est parce qu'il contient les alexines aussi bien que la substance sensibilisatrice. Au contraire, dans l'organisme vivant, tous les éléments cellulaires sont intacts, les alexines sont donc renfermées dans les leucocytes, et la substance sensibilisatrice seule circule dans le sang et se fixe sur les spermatozoïdes.

Voilà pourquoi ceux-ci sont sensibilisés et non tués.

D'autres expériences confirment cette conclusion.

Si l'on injecte dans le péritoine d'un cobaye, dont le sang est autotoxique, des spermatozoïdes vivants dans du liquide physiologique, et si l'on examine ensuite l'exsudat péritonéal, dans 3, 4, 5 minutes on voit ce qui suit. Aussitôt après l'injection, il se produit une rapide phagolyse; les spermatozoïdes sont encore vivants : 2, 3 et 5 minutes après que la phagocytose a eu lieu, tous les spermatozoïdes sont tués.

Tout autre est le tableau qui se présente si le même cobaye à sang autotoxique est d'abord traité par des injections de liquide physiologique ou de petites doses de sérum leucotoxique.

Dans ce cas la phagolyse est très insignifiante après l'injection des spermatozoïdes vivants dans le péritoine, et ils y vivent pendant plus d'une heure. La phagocytose s'établit très rapidement. Il se produit une vraie lutte entre les phagocytes et les spermatozoïdes. Beaucoup de spermatozoïdes sont englobés vivants; tandis que leur corps est déjà renfermé dans le leucocyte, leur flagellum se meut avec vitesse en dehors.

Cette même expérience peut être modifiée.

Avec un tube effilé, on retire un peu de liquide péritonéal au cobaye préparé comme je viens de le décrire. On garde ce liquide pendant quelque temps à la glacière, ce qui tue assez vite les leucocytes. Si on ajoute à ce liquide une goutte de spermatozoïdes, ils meurent après 3-5 minutes.

Si l'on injecte au même animal des spermatozoïdes dans le péritoine et si l'on retire après quelques minutes du liquide péritonéal contenant une quantité de leucocytes intacts, et si on met le liquide dans une goutte suspendue, on voit que les spermatozoïdes y vivent assez longtemps : 20-30 minutes.

J'ai de même observé plusieurs fois que les spermatozoïdes

mouraient plus vite dans la cavité péritonéale lorsqu'on les y introduisait dans de l'eau physiologique *non* chauffée, ce qui renforce la phagolyse.

Au contraire, en injectant les spermatozoïdes dans le péritoine avec de l'eau physiologique, chauffée à 36°, on observe qu'ils résistent plus longtemps.

Tout ceci confirme l'opinion plusieurs fois émise par Metchnikoff, d'après laquelle les cytotoxines se produiraient dans les phagocytes, et ne seraient que des ferments digestifs intracellulaires.

J'ai injecté le sérum autotoxique à plusieurs cobayes (mâles, femelles et châtrés) dans l'espoir d'obtenir une antitoxine. Mais le sérum chauffé à 56° ne neutralisait point l'autotoxine.

À côté des injections intrapéritonéales, j'en fis des sous-cutanées de spermatozoïdes vivants à un cobaye à sang fortement spermotoxique. C'était le même cobaye dans le péritoine duquel les spermatozoïdes mouraient en quelques minutes.

Il se produisait généralement au point d'injection un petit œdème. J'en retirais un peu d'exsudat à l'aide d'un tube effilé, à plusieurs intervalles précis. Je trouvais dans cet exsudat beaucoup de spermatozoïdes vivants à côté de globules rouges et une très petite quantité de leucocytes.

Même après 2 heures, les spermatozoïdes étaient complètement vivants sous la peau du cobaye à sérum spermotoxique.

Ensuite la quantité des spermatozoïdes diminuait rapidement et ils disparaissaient de l'œdème. Il est probable qu'étant mobiles, ils se transportaient dans toutes les directions sous la peau des cobayes.

Quelquefois cette disparition des spermatozoïdes s'opérait beaucoup plus vite : déjà après 20-30 minutes, il était impossible d'en retrouver un seul à l'endroit de l'injection.

Ceci confirme encore l'opinion de Metchnikoff sur l'origine phagocytaire des cytotoxines.

Ce sont surtout les faits suivants qui corroborent cette manière de voir.

Premièrement : *la destruction rapide des spermatozoïdes dans le péritoine du cobaye spermotoxique lorsqu'il y a phagolyse*, et, par contre, la destruction lente, lorsque la phagolyse est empêchée par n'importe quel moyen dans le péritoine du même cobaye.

Secondement, la mort rapide des spermatozoïdes dans le liquide péritonéal, dans lequel les phagocytes ont été préalablement tués par le froid, et, inversement, la résistance de ces spermatozoïdes dans le liquide péritonéal, dans lequel les leucocytes ont été conservés intacts.

Troisièmement, la résistance prolongée des spermatozoïdes sous la peau du cobaye spermotoxique, condition dans laquelle il n'y a pas de phagolyse, comme on sait.

Enfin cette opinion est confirmée par le fait que l'autospermotoxine est facilement obtenue, tandis qu'on n'a pas pu obtenir d'autotoxine pour les globules rouges, comme l'ont démontré Belfanti, Carbone et Bordet, et comme je l'ai observé moi-même en injectant au lapin du sang du lapin même.

En effet, les spermatozoïdes sont rapidement englobés par les phagocytes après l'injection; tandis qu'il n'y a pas de phagocytose après l'injection des globules rouges. C'est pourquoi il y a production d'autotoxines dans le premier cas et non pas dans le second.

On pourrait supposer qu'il n'y a pas d'autotoxine parce que l'antiautotoxine se produit très rapidement et neutralise l'autotoxine; par suite on ne trouve que de l'antiautotoxine dans le sang de ces animaux.

Pour résoudre cette question, j'ai injecté de l'autospermotoxine à plusieurs cobayes (mâles, femelles, châtrés). A mon grand étonnement, je n'ai pu du tout obtenir de l'antiautotoxine. Même le sérum de ces animaux, chauffé à 56°, ne pouvait neutraliser le sérum autotoxique.

En terminant j'exprime à M. Metchnikoff ma reconnaissance pour le sujet d'étude si intéressant qu'il m'a donné et pour son appui constant pendant mon travail.

ÉTUDE COMPARÉE DU VIBRION SEPTIQUE

ET DE

LA BACTÉRIE DU CHARBON SYMPTOMATIQUE

PAR MM. E. LECLAINCHE ET H. VALLÉE

Le vibrion septique et le *Bacterium Chauvæi* présentent morphologiquement d'étroites ressemblances. Les conditions étiologiques bien définies qui président à l'évolution de la septicémie gangréneuse se retrouvent pour le charbon symptomatique, et les lésions de ces deux maladies offrent de parfaites analogies.

On a donc été conduit à rapprocher, et même parfois à identifier, dans la classification bactérienne, les deux agents pathogènes.

En 1887, Roux et Chamberland démontrent qu'il est possible d'immuniser contre la septicémie, avec les substances solubles sécrétées par le vibrion. L'année suivante, Roux vaccine, par un procédé identique, les cobayes contre le charbon symptomatique; la parenté entre les deux microbes semble devoir s'affirmer d'autant plus, que les cobayes rendus réfractaires au charbon bactérien résistent souvent à l'inoculation du vibrion septique.

Kitasato ¹, ayant réussi à vacciner des cobayes contre le charbon symptomatique avec des cultures affaiblies, éprouve les animaux avec le bacille de l'œdème malin, et les voit tous succomber.

Duenschmann ² reprend, en 1894, la question de l'analogie du vibrion septique et du *Bacterium Chauvæi*. Il étudie spécialement l'immunisation réciproque. Quatre cobayes et deux lapins solidement immunisés contre le charbon symptomatique résistent à l'épreuve par le vibrion septique. Cet expérimentateur obtient, chez le lapin, un sérum actif contre le charbon

1. KITASATO, Ueber den Rauschbrandbacillus und sein Culturverfahren, *Zeitschrift für Hygiene*, t. VI, 1889, p. 1037.

2. DUENSCHMANN, Étude expérimentale sur le charbon symptomatique, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. VIII, 1894, p. 403.

symptomatique ; or ce même sérum neutralise des doses mortelles de sang septique.

Au cours de nos recherches sur le charbon symptomatique, nous avons étudié les rapports du vibrion septique et du *Bacterium Chauvei* au double point de vue des propriétés spéciales à ces microbes, et de l'immunité contre les maladies qu'ils déterminent.

MORPHOLOGIE. — On ne saurait établir une différenciation nette entre les lésions de la septicémie et celles du charbon symptomatique, lorsqu'on opère avec des virus qui n'ont pas subi de modifications expérimentales (atténuation ou exaltation).

Il y a cependant des différences à noter dans les formes microbiennes trouvées au sein des lésions septiques et charbonneuses chez le cobaye.

Si l'autopsie est pratiquée très peu de temps après la mort, on ne trouve pas de formes longues, flexueuses, ni dans la sérosité de l'œdème, ni dans la tumeur musculaire des cobayes qui succombent au charbon symptomatique ; ce sont les formes droites, courtes, qui dominent ; les formes en fuseau ou en raquette se trouvent aussi assez abondantes. Dans les lésions provoquées par un vibrion septique d'activité moyenne, on trouve toujours, au contraire, des formes longues, associées à des bacilles droits plus courts et à de rares articles sporulés.

Dans le péritoine des cobayes qui succombent à la septicémie, on rencontre, aussitôt après la mort, des formes longues très inégales et flexueuses du microbe. On obtient de fort belles préparations de vibrion en appliquant une lame à la surface du foie et en colorant par la méthode de Gram-Nicolle.

On ne constate jamais rien de semblable chez le cobaye tué par la bactérie du charbon symptomatique ; l'examen de la surface du foie révèle l'existence de formes relativement courtes, droites et de longueur sensiblement constante.

Cette méthode est excellente pour s'assurer si l'on dispose d'un virus symptomatique pur, exempt de souillure par le vibrion septique ; si l'on trouve dans le péritoine du cobaye inoculé des formes longues, on peut être assuré qu'on est en présence d'une infection surajoutée par le vibrion septique, et que ce microbe se trouvera associé, dans le sang du cœur, à la bactérie du charbon symptomatique.

IMMUNISATION. — Les différentes méthodes d'immunisation sont applicables à la fois à la septicémie gangréneuse et au charbon symptomatique.

a) *Virus vaccins*. — Nous avons réussi à vacciner des cobayes contre la septicémie gangréneuse par un procédé analogue à celui indiqué par MM. Arloing et Cornevin pour le charbon symptomatique. Du sang septique, recueilli en ampoules scellées, est placé pendant 5 jours à l'étuve à 37°. Au bout de ce temps, tous les vibrions sont sporulés ; le sang est alors desséché en couches minces, dans des boîtes de verre stérilisées. Le produit de grattage reste très longtemps virulent. Pour préparer le vaccin, on mélange 1 partie, en poids, de poudre virulente à 1/2 partie d'eau ; le liquide, étalé sur le couvercle d'une boîte de Pétri, est porté à l'étuve à 92°, pendant 7 heures.

On obtient, après trituration de la pellicule qui recouvre la plaque de verre, une poudre brune qui, inoculée à des cobayes de forte taille, les tue à la dose de 5 centigrammes en moins de 20 heures. Des doses inférieures à 1 centigramme, diluées dans de l'acide lactique à 1 pour 5, tuent comme le virus non chauffé.

Les cobayes qui reçoivent 1 ou 2 centigrammes de poudre vaccinale ne présentent que des accidents locaux sans gravité, ils résistent, 15 jours plus tard, à l'inoculation de doses mortelles de virus. Les cobayes qui ont reçu 2 centigrammes de vaccin résistent à l'inoculation de 1 goutte entière de sérosité septique ; ceux qui reçoivent 1 centigramme de vaccin résistent, dans la proportion de 1 sur 2, à l'épreuve par 1/2 goutte de sérosité virulente qui tue les témoins en 15 heures.

b) *Toxines*. — MM. Roux et Chamberland ont démontré qu'il est possible d'immuniser les cobayes contre la septicémie en leur inoculant, à plusieurs reprises, des cultures stérilisées par le chauffage à 105°-110° pendant 10 minutes, ou le liquide que l'on obtient en filtrant sur porcelaine les jus virulents qui s'écoulent des lésions d'un animal mort de septicémie.

Roux a fait, peu de temps après cette importante constatation, une démonstration identique pour le charbon symptomatique.

c) *Sérothérapie*. — En 1898, l'un de nous ¹ obtient un sérum

1. E. LECLAINCHE, Sur la sérothérapie de la gangrène gazeuse, *Archives médicales de Toulouse*, 1898, n° 21, p. 397.

immunisant contre le vibrion septique, chez l'âne traité par des inoculations multiples de jus virulents dans les veines et dans le tissu musculaire ¹. Ce sérum possède des propriétés si énergiques que la sérothérapie préventive est pratiquement réalisable, et « qu'il devient facile d'immuniser à la fois les blessés contre le tétanos et contre la gangrène ».

Un mélange de 2 c. c. de sérum et de 5 gouttes de sérosité septique ne produit aucun accident chez le cobaye, alors que les témoins succombent en 8-15 heures. « Les animaux qui ont reçu le mélange sérum-virus ne possèdent aucune immunité : inoculés après 2, 10 ou 20 jours avec une dose faible de virus, ils succombent aussi sûrement et aussi rapidement que les témoins. »

Tout ce que nous venons de dire de la sérothérapie de la gangrène gazeuse s'applique à celle du charbon symptomatique, ainsi que nous l'avons démontré avec le cobaye, et que M. Arloing l'a constaté, chez le mouton et chez le bœuf.

Kitt réalise, en 1899, l'immunisation du cheval contre le charbon symptomatique par des injections intra-veineuses de jus virulents; il montre que les solipèdes constituent les sujets de choix pour la production d'un sérum rapidement immunisant. Nous avons obtenu aussi d'excellents résultats en immunisant des chevaux par des injections intra-veineuses de jus virulents ou de cultures du *B. Chauvæi* en bouillon Martin.

Donc, au point de vue des méthodes d'immunisation, le vibrion septique et le *B. Chauvæi* se comportent de façon identique.

L'immunité conférée contre le charbon symptomatique permet-elle aux animaux de résister à la gangrène gazeuse?

On ne peut protéger le cobaye contre le vibrion septique par l'inoculation préventive de fortes doses d'un sérum immunisant contre le charbon symptomatique. Les cobayes qui reçoivent 5 et même 10 c. c. de sérum symptomatique, puis, 24 heures après, une goutte de sang ou de sérosité septiques, meurent aussi vite que les témoins, tandis que les cobayes traités avec

1. L'inoculation intra-veineuse de cultures en bouillon Martin donne aussi un sérum très actif.

des doses égales où cinq fois moindres de sérum anti-charbonneux résistent bien à l'épreuve par le charbon symptomatique.

Exp. — *Cob.* 297 et 298 reçoivent préventivement 5 c. c. de sérum anticharbonneux (saignée du 3 mars 1900).

Cob. 303 et 304 reçoivent préventivement 5 c. c. de sérum anticharbonneux (saignée du 1^{er} mai).

24 heures après l'injection du sérum, les cobayes 297 et 303 reçoivent, ainsi qu'un témoin, 1 goutte de jus septique. Le cobaye témoin meurt en 10 heures; les deux sujets traités succombent en 12 heures. Les cobayes 298 et 304, éprouvés en même temps avec 3 gouttes de culture de charbon symptomatique, résistent bien; le témoin meurt en 16 heures.

L'expérience, plusieurs fois répétée, a toujours donné des résultats comparables¹. Nous avons prié M. Nocard de vouloir bien étudier l'action de notre sérum anticharbonneux sur les vibrions septiques dont il dispose; les résultats qu'il a obtenus sont identiques aux nôtres: les cobayes inoculés préventivement avec le sérum succombent à la septicémie, tandis qu'ils résistent au charbon symptomatique.

D'autre part, nous avons recherché si l'immunité durable conférée aux animaux par une inoculation de virus atténué du charbon symptomatique, puis de virus fort, leur permet de résister à la septicémie. Dans plusieurs séries d'expériences, nous avons éprouvé, avec un vibron d'activité moyenne, des cobayes immunisés avec des vaccins pulvérulents ou des vaccins purs liquides, et qui avaient résisté à l'épreuve de contrôle. Tous nos animaux ont succombé à la septicémie.

Nous sommes convaincu que si les auteurs qui ont traité cette question avant nous ont obtenu des résultats différents des nôtres, c'est qu'ils ont utilisé, pour leurs vaccinations, des virus à la fois symptomatiques et septiques.

Il ne faut pas oublier que la souillure par le vibron septique des cadavres des cobayes morts de charbon symptomatique est rapide et presque certaine. En employant pour immuniser les animaux des jus virulents actifs ou filtrés sur porcelaine, on s'expose à leur donner à la fois les microbes symptomatique et septique ou leurs toxines, et par suite à les immuniser, plus ou

1. Pour nos épreuves, nous avons utilisé des vibrions de diverses provenances (cheval, cobaye, homme); notre sérum antigangréneux s'est toujours montré actif contre ces vibrions.

moins inégalement, contre les deux maladies à la fois. C'est sans aucun doute en raison de ces souillures que l'on voit la moitié des animaux vaccinés à l'aide des toxines contre le charbon symptomatique résister aussi à l'épreuve par le vibrion septique.

Duenschmann obtient chez le lapin un sérum actif à la fois contre le charbon symptomatique et la septicémie. Mais si l'on analyse les expériences de l'auteur, on arrive à cette conviction que le virus symptomatique utilisé dans ses recherches était impur. Duenschmann part, en effet, pour immuniser ses lapins, d'un virus renforcé qui a pour souche le sang d'un cobaye, dans le péritoine duquel il rencontre « les formes longues du microbe, en filaments qui traversent le champ d'observation quelquefois d'un bout à l'autre ». Il s'agit à l'évidence du vibrion septique, car jamais le charbon symptomatique ne donne ces formes longues dans les conditions indiquées; il n'est pas douteux que le sang de ce cobaye, qui a servi à des inoculations successives, contenait à la fois le vibrion septique et le *B. Chauvœi*.

En se servant de cultures pures pour immuniser les cobayes contre le charbon symptomatique, Kitasato a vu au contraire les animaux succomber à la septicémie.

Il faut également remarquer que le lapin, naturellement réfractaire au charbon symptomatique, est réceptif pour la septicémie gangréneuse.

Jamais nous n'avons pu empêcher ou arrêter l'infection symptomatique avec le sérum antigangréneux. Nous signalerons ici que des sérums indifférents, provenant du cheval, neutralisent par mélange le virus du charbon symptomatique. Le sérum antigangréneux que nous préparons prolonge de quelques heures la vie des animaux inoculés avec le charbon symptomatique, sans jamais empêcher leur mort.

AGGLUTINATION. — Le sérum antigangréneux agglutine en quelques minutes les cultures jeunes du vibrion septique en bouillon Martin. Au 1/30, la précipitation se fait instantanément en gros flocons, alors qu'un sérum indifférent agglutine au 1/10 en plusieurs heures seulement. A 1/3,000, l'agglutination se fait très rapidement, elle est encore rapide à 1/15,000, et assurée à 1/30,000. Dans le vide, des doses de sérum qui agglutinent très vite à l'air peuvent rester sans effet.

De même le sérum contre le charbon symptomatique agglutine très bien les cultures pures du *B. Chauvæi*.

Nous avons recherché le pouvoir agglutinant du sérum anti-gangréneux sur nos cultures du *B. Chauvæi*. A 1/30, nous n'avons obtenu l'agglutination totale qu'après plus de 12 heures, tandis qu'au 1/3,000, le sérum anti-symptomatique agglutine en moins de 40 heures.

Le sérum contre le charbon symptomatique n'agglutine qu'au 1/30 au moins, en petits flocons, et après plusieurs heures, les cultures jeunes de vibron septique: les sérums indifférents se comportent de la même façon. Nous avons dit plus haut que des doses infinitésimales de sérum antigangréneux provoquent instantanément une agglutination très nette. Ces faits nous autorisent à conclure que notre sérum anti-symptomatique n'exerce aucune action agglutinante spécifique sur les cultures du vibron septique.

En résumé :

1° Il existe entre la bactérie du charbon symptomatique et le vibron septique des rapports biologiques très étroits.

Il est possible de différencier cependant les deux microbes : le vibron septique donne, dans la sérosité de l'œdème spécifique et dans le péritoine du cobaye, des formes longues qui font régulièrement défaut avec le charbon symptomatique¹.

2° On peut étendre à l'immunisation contre le vibron septique toutes les méthodes applicables au charbon symptomatique.

3° Les sérums immunisants contre le charbon symptomatique et la septicémie gangréneuse exercent une action rigoureusement spécifique. L'épreuve de l'agglutination par les mêmes sérums est également spécifique.

4° L'immunisation à l'égard du charbon symptomatique n'implique point la résistance au vibron septique, et réciproquement les animaux vaccinés contre la septicémie ne le sont pas contre le charbon symptomatique.

1. Le mode de différenciation des deux agents par l'inoculation au lapin n'a qu'une valeur restreinte. Nocard et Roux ont montré que les lapins peuvent succomber au charbon symptomatique; nous avons vu aussi fréquemment le lapin mourir à la suite de l'inoculation de ce virus.

QUELQUES EXPÉRIENCES SUR LA PESTE A PORTO

PAR LE D^r MÉTIN

MÉDECIN PRINCIPAL DES COLONIES

En dehors des cas de pneumonie pesteuse primitive, que l'on rencontre d'ailleurs assez rarement, on observe fréquemment dans la peste des complications pulmonaires se traduisant à l'auscultation par des signes de broncho-pneumonie. Les crachats des malades renferment dans ces deux cas une abondance plus ou moins grande de bacilles d'Yersin, mis en évidence soit par les préparations directes, soit par les cultures, mais surtout plus facilement par l'inoculation aux animaux. Pendant la période d'état de la broncho-pneumonie pesteuse, les bacilles des crachats sont tout aussi virulents que ceux qu'on retire soit du sang, soit du bubon : ils amènent la mort de la souris en 36-48 heures, et celle du cobaye en 3-4 jours.

La question se pose de savoir pendant combien de temps les bacilles pesteux se retrouvent dans les crachats, et surtout s'ils conservent leur virulence dans ces crachats lorsque le malade est entré en convalescence. On conçoit l'importance de cette question, car si les bacilles pesteux se maintiennent longtemps virulents dans les crachats des convalescents, il est nécessaire de prendre des mesures spéciales contre une source des plus dangereuses de dissémination du bacille.

D'après M. Gotschlich ¹, dans les expériences qu'il a faites à Alexandrie, on retrouverait virulents les bacilles pesteux dans les crachats des convalescents de pneumonie pesteuse, non seulement pendant la maladie elle-même, mais encore jusqu'aux 20^e, 33^e, et 48^e jours après la défervescence complète. A Porto, nous avons pu observer huit malades ayant guéri après avoir présenté des symptômes de broncho-pneumonie pesteuse. Deux de ces malades, des infirmières, avaient contracté une pneumonie pesteuse primitive en soignant à l'hôpital des malades atteintes elles-mêmes de peste bubonique avec complications pulmonaires.

1. GOTSCHLICH, *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskr.*, XXXII, 3.

Les 6 autres malades avaient eu la peste avec bubons siégeant soit au cou, soit aux aisselles, et les signes de broncho-pneumonie s'étaient présentés vers le 4^e jour de la maladie.

Les crachats de ces malades, pendant la période d'état, inoculés à la dose de 1 c. c. dans le péritoine du cobaye, avaient entraîné la mort de l'animal en 3 à 5 jours, et dans les organes de l'animal on retrouvait le coccobacille à l'état de pureté. Nous avons pu suivre ces malades après leur guérison, et injecter leurs crachats à des cobayes, à des intervalles variés, après la défervescence.

Malgré la richesse des crachats en microorganismes variés, nous n'avons pas hésité à employer la voie intrapéritonéale dans toutes nos expériences : lorsque le bacille pesteux était encore virulent, l'animal a succombé à la peste, le microbe d'Yersin se retrouvant pur dans les organes. Dans les cas où, au contraire, le bacille pesteux était absent ou tout au moins avait perdu sa virulence, les autres microbes contenus dans les crachats n'ont eu aucune influence sur la santé de l'animal. En tout cas nous n'avons jamais observé d'autres causes de la mort que celle qui était due à la peste elle-même.

EXPÉRIENCES

1^o BALIEHA DE LIMA. — Peste bubonique : bubons axillaires et sous-maxillaires. Le 21 novembre, complications pulmonaires : on rencontre de nombreux bacilles pesteux dans les crachats. Un cobaye reçoit le 22 novembre dans le péritoine 1 c. c. de crachats ; il meurt en 4 jours de peste confirmée à l'examen des organes. Le malade entre en convalescence le 30 novembre ; apyrexie à partir de cette date.

Cobaye 1. Le 15 décembre, soit 16 jours après la défervescence, on injecte dans le péritoine d'un cobaye 1 c. c. de crachats.

Les deux jours suivants, l'animal mange peu, mais a gardé toute sa vivacité : il n'y a pas de douleur à la pression de l'abdomen, pas de ganglions, pas de fièvre. A partir du 3^e jour, le cobaye a repris tout son appétit, et il se porte très bien à mon départ de Porto, le 20 janvier.

Cobaye 2. Reçoit le 20 décembre, dans le péritoine, 1 c. c. de crachats du même malade, 21 jours après la défervescence.

Le cobaye ne présente rien de particulier, et est laissé en bonne santé.

2^o PADUA. — Peste avec bubons sous-maxillaires : les crachats renferment des bacilles pesteux le 21 novembre et tuent le cobaye en 3 jours. Apyrexie à partir du 1^{er} décembre.

Cobaye 3. Le 8 décembre, 7 jours après la défervescence, on injecte dans le péritoine d'un cobaye 1 c. c. de crachats de ce malade. Le deuxième jour, apparition d'un ganglion dans les deux aines, perte de l'appétit, douleurs abdominales, fièvre. Le cobaye meurt le 13 décembre ; à l'autopsie, bubons comme des noisettes dans les aines, et comme des lentilles dans le mésentère ; la rate est farcie de pseudo-tubercules ; tous les organes renferment le bacille d'Yersin.

Cobaye 4. Le 15 décembre, 14 jours après la défervescence, on injecte 1 c. c. de crachats dans le péritoine d'un cobaye : l'animal n'est pas malade, et est laissé en bonne santé le 20 janvier.

Cobaye 5. Même expérience le 9 janvier, soit 40 jours après la défervescence. Le cobaye est bien portant à notre départ.

3^o LOBO. — Peste avec complications pulmonaires : le 21 novembre, bacilles dans les crachats, virulents pour le cobaye qu'ils tuent en quatre jours. Apyrexie le 26 novembre.

Cobaye 6. Le 2 décembre, 7 jours après la convalescence, on injecte dans le péritoine d'un cobaye 1 c. c. de crachats de ce malade : l'animal meurt en 6 jours avec tous les symptômes de la peste : le bacille d'Yersin se retrouve gros et allongé dans tous les organes : la rate est farcie de pseudo-tubercules.

Cobaye 7. Même expérience avec des crachats du 11 décembre, soit 17 jours après le retour à l'apyrexie. L'animal continue à se bien porter.

Cobaye 8. Ce cobaye reçoit le 18 décembre 1 c. c. de crachats dans le péritoine, et est laissé en bonne santé.

4^o LÉOP. GOMEZ. — Peste très grave, non traitée au sérum, bacilles dans les crachats du 1^{er} décembre, tuant le cobaye en 3 jours. Apyrexie le 23 décembre.

Cobaye 9. Reçoit le 30 décembre, soit 7 jours après la convalescence, 1 c. c. de crachats dans le péritoine : il meurt en 5 jours avec les lésions ordinaires de la peste, et le bacille d'Yersin dans tous les organes.

Cobayes 10 et 11. Reçoivent des crachats à la dose de 1 c. c. dans le péritoine : le premier le 6 janvier, le second le 13 janvier, soit 15 et 21 jours après la convalescence. On n'observe rien de particulier.

5° ALB. CARDOSE. — Peste grave, non traitée au sérum : les crachats renferment des bacilles pesteux le 6 décembre, et tuent le cobaye en 4 jours. Apyrexie le 20 décembre.

Cobaye 12. Inoculé selon le même procédé que les précédents le 28 décembre, soit 8 jours après l'apyrexie, ce cobaye meurt en 7 jours avec toutes les lésions de la peste.

Cobayes 13 et 14. Les 4 et 10 janvier, soit 14 et 20 jours après la convalescence, on injecte 1 c. c. de crachats à 2 cobayes qui continuent à se bien porter.

6° GRAC. MARIA. — Peste de gravité moyenne, non traitée : bacilles dans les crachats le 11 décembre, tuant le cobaye en 5 jours. Apyrexie le 20 décembre.

Cobaye 15. Meurt en 6 jours après inoculation intrapéritonéale de 1 c. c. de crachats faite le 27 décembre, 7 jours après la défervescence. A l'autopsie on retrouve les lésions pesteuses et le bacille dans tous les organes.

Cobayes 16 et 17. Restent bien portants malgré l'inoculation dans le péritoine de 1 c. c. de crachats les 30 décembre et 10 janvier, c'est-à-dire 10 et 21 jours après le retour à l'apyrexie.

7° CAROLINA. — Peste pneumonique primitive, non traitée : bacilles dans les crachats le 9 décembre, apyrexie le 19 du même mois.

Cobaye 18. Reçoit dans le péritoine 1 c. c. de crachats le 26 décembre, soit 7 jours après la défervescence. Il meurt le 2 janvier, et le bacille pesteux se retrouve dans tous les organes.

8° PHILOMÈLE. — Pneumonie pesteuse primitive : les bacilles pesteux sont constatés dans les crachats le 9 décembre. Apyrexie le 21 décembre.

Cobaye 19. Le 30 décembre, 9 jours après l'apyrexie, on injecte 1 c. c. de crachats dans le péritoine d'un cobaye, qui paraît légèrement malade les 2 premiers jours, avec diminution de l'appétit et de la vivacité, mais sans fièvre ni bubons, et qui se rétablit complètement le 4^e jour après l'inoculation. Des prises de sang n'ont donné lieu à aucune culture pendant les deux jours où l'animal paraissait indisposé.

De ces expériences il est permis de conclure que si les bacilles d'Yersin persistent encore virulents dans les crachats des pesteux ayant eu des complications pulmonaires jusqu'au 8^e jour après la défervescence, alors que l'auscultation ne révèle plus aucun trouble dans le poulmon, leur virulence est néanmoins atténuée dans une certaine mesure, puisqu'ils ne tuent plus le cobaye qu'en 5 à 7 jours, au lieu de 3 à 4. De plus, à partir du 9^e jour après le retour à l'apyrexie, l'inoculation de ces crachats dans le péritoine du cobaye ne cause plus la mort de cet animal. On peut donc considérer comme inoffensifs les crachats des malades lorsque 10 jours se sont écoulés à partir de la disparition complète de la fièvre et de tout signe stéthoscopique. Nous devons dire que pendant les 8 ou 9 jours où les crachats ont encore amené la mort du cobaye, nous n'avons jamais pu y voir le bacille pesteux au moyen du microscope et des préparations directes.

La persistance des bacilles d'Yersin et de leur virulence dans les crachats des pesteux pendant les premiers jours de la convalescence est un fait d'une extrême importance au point de vue de la dissémination de la maladie, et en même temps il pourrait être la cause d'une nouvelle réinfection du malade lui-même. Dans le bubon pesteux, le bacille peut également persister un certain temps; dans quelques cas nous avons observé une véritable rechute de la maladie chez des sujets qui avaient été considérés comme guéris. Deux de ces malades sont morts ainsi tardivement d'accidents cérébraux dus au bacille pesteux qui, après avoir sommeillé, pour ainsi dire, sans causer de troubles apparents pendant la convalescence, a repris une vitalité nouvelle. Ce sont des cas de rechute plutôt que de récurrence.

Jusqu'à présent, en effet, on ne connaît que fort peu de cas de récurrences authentiques de la peste. La raison de la non-récurrence dans cette maladie nous a paru intéressante à étudier, et dans ce but nous avons étudié les propriétés du sérum des malades guéris. Nous avons choisi des sujets qui n'avaient pas reçu le traitement par le sérum anti-pesteux. Trois malades ont bien voulu nous autoriser à leur prendre une certaine quantité de sang dans la veine. — Ils avaient été atteints de peste, sans complications pulmonaires, et d'une intensité légère pour l'un d'eux, grave pour les deux autres.

La petite quantité de sérum que nous avons pu nous procurer ne nous a pas permis de faire des expériences absolument complètes. D'autre part, les malades qui avaient bien voulu nous fournir du sang étaient déjà en convalescence à notre arrivée à Porto; nous n'avons pu, par suite, expérimenter les propriétés de leur sérum vis-à-vis du microbe même qui avait été la cause de leur maladie. Néanmoins nous croyons utile de consigner les résultats de nos expériences, si imparfaits qu'ils soient.

1^o JOSE D... — Peste légère, donne 10 c. c. de sang dont on retire environ 5 c. c. de sérum.

Cobaye 1, reçoit 1 c. c. de sérum sous la peau, et le lendemain on lui injecte, également sous la peau, 1/2 c. c. de culture en bouillon de 24 heures d'un bacille pesteux qui, à la même dose, tue le cobaye témoin en trois jours. — L'animal survit.

Cobaye 2, reçoit sous la peau 1/2 c. c. du bacille pesteux ci-dessus, et le lendemain on lui injecte 1 c. c. de sérum. Ce cobaye est malade pendant environ 5 jours, avec bubons dans les aines, fièvre, perte de l'appétit. Après ce temps il finit par se rétablir complètement.

2^o FREDERICO B... — Peste grave, 10 c. c. de sang; 5 c. c. de sérum.

Cobaye 3. On injecte à ce cobaye, sous la peau, 1 c. c. de ce sérum, et le lendemain, 1/2 c. c. d'une culture en bouillon d'un bacille pesteux tuant le cobaye témoin en 3 jours et demi.

Ce cobaye paraît malade les 2 premiers jours : néanmoins on ne sent pas de bubons; et l'animal n'a pas de fièvre; il se rétablit.

Cobaye 4. — 24 heures après avoir injecté 1/2 c. c. de culture en bouillon du même bacille pesteux que pour le précédent, on injecte 1 c. c. de sérum Fred. B. Le cobaye meurt en 10 jours : œdème considérable au point d'inoculation. Bubons dans les aines. La rate est volumineuse. Tous les organes renferment le bacille pesteux, gros et allongé. Quelques bacilles sont allongés, et on trouve des granulations dans beaucoup de globules blancs.

3^o ANTONIO C... — Peste grave, 15 c. c. de sang donnent 6 c. c. de sérum.

Cobayes 5 et 6. Les mêmes expériences au point de vue de propriétés préventives et curatives de ce sérum sont faites sur ces deux cobayes. Alors que le témoin meurt en 3 jours, ces deux cobayes survivent.

Nous avons refait, à l'Institut Pasteur, avec le concours amical de M. Dujardin-Beaumetz, une autre série d'expériences en nous servant de la souris, animal plus sensible à la peste que le cobaye. Les microbes qui nous ont servi dans ces expériences étaient le bacille dit de Djeddah, dont la piqûre tuait la souris témoin en 60 heures, et le bacille de la Réunion qui amenait la mort du témoin en 48 heures.

I. SÉRUM JOSÉ D... — *Souris* 1. Reçoit $1/2$ c. c. de ce sérum sous la peau du dos et, le lendemain, une piqûre de b. de Djeddah. La souris meurt en 7 jours : survie 4 jours $1/2$.

Souris 2. On injecte 1 c. c. de ce sérum 24 heures avant une piqûre de b. de la Réunion : elle meurt avec une survie de 3 jours $1/2$.

Souris 3. On pique cette souris avec le bacille de Djeddah, et le lendemain on lui injecte $1/4$ de c. c. sérum José D. La souris meurt en 8 jours, avec une survie de 5 jours et demi.

Souris 4. — Reçoit une piqûre de Djeddah, et le lendemain une injection de $1/10$ de c. c. de sérum José D. Elle meurt avec une survie de 42 heures.

II. SÉRUM ANTONIO C... — *Souris* 5. Une dose de $1/2$ c. c. de ce sérum, injectée 24 heures avant une piqûre de Djeddah, retarde la mort de cette souris de 4 jours $1/2$.

Souris 6. Reçoit 1 c. c. de sérum Antonio C. sous la peau; 24 heures après, on la pique avec le bacille de la Réunion. Elle meurt 15 jours après la piqûre, soit une survie de 13 jours.

Souris 7. $1/10$ de c. c. de ce sérum ne retarde la mort que de 42 heures chez cette souris qui a été piquée avec une culture de Djeddah.

III. SÉRUM FREDERICO B... — *Souris* 8. Reçoit $1/2$ c. c. de ce sérum dans le dos. 24 heures après, on la pique avec une culture de Djeddah. Elle meurt en 90 heures : survie 30 heures.

Souris 9. On injecte à cette souris 1 c. c. de sérum Frederico, et le lendemain on la pique avec une culture de la Réunion; la survie est de 3 jours $1/2$.

Ces expériences montrent que le sérum des malades guériss

naturellement de la peste, sans avoir reçu le traitement par le sérum antipesteux, jouit de propriétés légèrement préventives et même curatives. Chez le cobaye, nous avons, sauf dans un seul cas, toujours observé la survie des animaux en expérience, que le sérum ait été employé à titre préventif ou à titre curatif. S'il n'en a pas été de même pour la souris, cela peut tenir à deux causes : la plus grande sensibilité de cet animal vis-à-vis du coccobacille d'Yersin, ou bien la longue durée pendant laquelle nous avions conservé le sérum avant de renouveler nos expériences. Bien que le sérum ait été maintenu dans des tubes scellés à la lampe, il est possible que les trois mois qui se sont passés entre la prise du sang et l'expérimentation du sérum aient atténué les propriétés qu'il a montrées dans nos expériences chez le cobaye.

Contribution à la nutrition intracellulaire des levures

PAR E. KAYSER

(Travail du laboratoire des fermentations à l'Institut agronomique.)

Les boissons fermentées subissent en vieillissant des variations d'acidité d'origines diverses. Il y en a de chimiques : précipitation de la crème de tartre dans les vins, phénomènes d'éthérification; d'autres sont d'origine microbienne et sont dues à diverses espèces de bactéries et de mycodermes.

Y en a-t-il qui doivent être mises au compte de la levure? c'est ce dont on a longtemps douté et ce qui a été mis en lumière par les travaux de divers savants.

Pasteur, cultivant de la levure dans un milieu nutritif additionné d'acide racémique, a montré qu'elle faisait d'abord disparaître l'acide droit en laissant l'acide gauche intact.

Naegeli nous a appris que la levure était apte à prendre le carbone, nécessaire à la constitution de ses tissus, à beaucoup d'hydrates de carbone, à divers acides organiques, et il a vu que la présence de l'oxygène favorisait beaucoup cette assimilation.

Boussingault, Goethe et Kulisch ont constaté des diminutions notables et progressives d'acidité dans les cidres; ce dernier savant cite même un cas où la diminution de l'acidité d'un cidre a atteint 40 0/0 de l'acidité primitive.

Des faits analogues ont été trouvés avec les vins par A. Czéh, Muller-Thurgau et Kulisch.

Kulisch, le premier, attribue cette diminution d'acidité à la levure et il y voit un phénomène d'ordre vital. Ayant constaté des diminutions d'acidité très sensibles dans les bouteilles de vin complètement remplies et maintenues à l'abri de l'air, il élimine la levure par filtration, ou la détruit par chauffage, et il voit la diminution de l'acidité s'arrêter complètement.

Wortmann nous a montré que la disparition des divers acides dépendait de l'espèce de levure employée, et qu'en général l'acide malique était le plus facilement détruit.

Il est très probable que beaucoup de facteurs interviennent ici : c'est ce qui résulte d'une étude de M. Schukow.

Ce savant, opérant avec des milieux naturels (jus de raisins) ou artificiels, additionnés de divers acides, a fait voir que diverses levures pouvaient faire disparaître ces acides en quantités variables; c'est ainsi que l'acide citrique disparaissait plus facilement que l'acide succinique; il est probable que chaque levure a ses préférences.

Schukow a, en outre, constaté que la diminution était, en général, plus forte dans les milieux nutritifs aérés et riches en azote.

De toutes ces recherches, il résulte donc que le ferment alcoolique intervient dans la disparition de l'acidité des boissons fermentées, et il y a à se demander quand et comment il exerce cette action.

La question ne présente pas un intérêt pratique bien considérable, car les boissons fermentées sont, en général, séparées aussitôt de leurs lies. De plus ces actions de combustion exigent le contact de l'oxygène de l'air, qui entre très difficilement dans les vases vinaires et disparaît très vite du liquide, comme l'a montré Pasteur, employé qu'il est à des oxydations d'ordre chimique. Néanmoins, la question présente un certain intérêt, et j'ai été d'autant plus encouragé à l'aborder que jusqu'à présent personne n'a étudié séparément les variations de l'acidité fixe et celles de l'acidité volatile.

En faisant ce départ, on peut espérer voir un peu ce qui se passe dans la nutrition intra-cellulaire de la levure.

Dans ce travail, les acidités totales, titrées à l'eau de chaux, sont exprimées en grammes et en milligrammes par litre; elles ont été calculées en équivalents de l'acide employé dans l'expérience. Les acides volatils, dosés d'après la méthode des distillations fractionnées de M. Duclaux, sont exprimés en acide acétique et en milligrammes par litre.

Lorsqu'on avait affaire à l'acide succinique comme seul acide fixe, soit qu'il ait été ajouté au liquide soumis à la fermentation, soit qu'il fût produit par fermentation, les nombres obtenus sont faciles à interpréter. Si l'on a d'autres acides fixes mélangés à l'acide succinique, on peut appliquer la méthode de M. Laborde.

Elle consiste à évaporer à siccité au bain-marie le liquide

fermenté en présence de sable, et à traiter ensuite l'extrait desséché, additionné de grenailles de plomb, par l'éther à froid ou encore à chaud par un appareil à épuisement.

M. Laborde nous a montré qu'il pouvait y avoir une éthérification quelquefois forte pendant l'évaporation, grâce à la présence de la glycérine : aussi les nombres trouvés pour l'acide succinique par l'extraction à l'éther sont souvent notablement inférieurs à ceux calculés par différence entre l'acidité totale et volatile ; mais on peut retrouver, par une saponification, l'acide succinique qui disparaît à l'état d'éther.

On peut encore empêcher cette éthérification en procédant comme suit : on évapore à siccité complète le liquide fermenté, neutralisé préalablement à l'eau de chaux titrée ; on met les acides en liberté en faisant bouillir avec une quantité d'acide oxalique correspondant à l'eau de chaux employée, on filtre et on applique la méthode de M. Laborde.

En dehors de ces éthers formés pendant l'évaporation du liquide, il s'en produit d'autres pendant toute la durée de la fermentation par suite des réactions qui ont lieu entre l'alcool, la glycérine, les acides préexistants ou produits, et leur quantité peut varier énormément, non seulement avec le temps, mais encore avec la levure en présence. En effet, les diverses levures placées dans les mêmes conditions de culture se multiplient plus ou moins, donnent des quantités variables d'alcool, de glycérine, d'acides, brûlent ces derniers plus ou moins vite, et dès lors peuvent réagir indirectement sur les phénomènes d'éthérification. Il était donc nécessaire de tenir compte de ces éthers formés, afin de ne pas compter comme acides disparus ceux qui auraient passé à l'état d'éthers, et pour éviter ainsi des erreurs d'interprétation qui pourraient résulter de la méconnaissance de ces variations. Ainsi j'ai trouvé une levure, isolée d'une lie de Château-Latour, qui donne beaucoup d'éther acétique, et qui, après avoir rendu le milieu acide, le rend ensuite alcalin dans des conditions spéciales sur lesquelles nous reviendrons dans un autre travail. Il y a toujours de l'acide acétique, mais il est à l'état d'acétate d'ammoniaque ; cette formation peut ainsi expliquer la disparition des acides, sans combustion directe par la levure.

Pour doser ces éthers, on a opéré comme suit : on évapore un certain volume de liquide en présence d'un excès de solution

potassique de volume et de titre connus, au bain-marie à sec; on retire l'excès de potasse par l'acide sulfurique, titré à nouveau par de la potasse décime. Les éthers ainsi obtenus sont calculés en acide succinique. Si nous soumettons ensuite le liquide à la distillation, après mise en liberté des acides par l'addition d'un excès d'acide tartrique ou d'acide sulfurique, on obtient les acides volatils libres et ceux qui étaient combinés à l'état d'éthers: comme on peut faire le dosage des acides libres à part, on a par différence les éthers volatils exprimés en acide acétique; il ne reste plus qu'à retrancher ces éthers volatils des éthers totaux pour avoir les éthers fixes. Je m'attacherai surtout à indiquer les résultats des expériences faites avec un seul acide fixe, le plus intéressant au point de vue qui nous occupe, l'acide succinique.

Dans un certain nombre d'expériences, nous montrerons par des courbes les variations des acides totaux, acides fixes, acides volatils, ainsi que celles de la somme des acides et des éthers correspondants dans un même ballon depuis le commencement jusqu'à la fin de l'expérience.

Ceci posé, indiquons brièvement le mode opératoire employé: la première analyse, correspondant à la fin de la fermentation, sert de point de départ, c'est-à-dire que toutes les variations constatées pendant la durée d'une expérience sont rapportées à celle-ci: ces variations sont quelquefois calculées en proportions centésimales et précédées des signes + ou —, selon qu'il s'agit d'une augmentation ou d'une diminution de l'acidité considérée.

Pour le prélèvement des échantillons, le mieux est de faire des prises successives dans un même ballon, en tenant compte de l'évaporation pendant le temps qui s'est écoulé entre les dates des diverses prises, et à rapporter ensuite tous les nombres à la concentration de la première analyse, c'est ce que j'ai fait dans une partie des expériences.

On peut également ensemer un certain nombre de matras de même dimension à l'aide de la même boucle de platine trempé dans une même culture, et à chaque analyse sacrifier un ou plusieurs matras. Certes on n'a pas le droit d'identifier tous ces matras, car les acidités totales et volatiles ne sont pas tout à fait les mêmes dans les différents matras ni au départ ni à la fin; je dois cependant ajouter que

dans nombre d'expériences, j'ai trouvé une identité presque absolue aussi bien au début qu'à la fin, et dès lors je crois que ce mode opératoire nous permet de nous faire une idée suffisante des variations d'acidité qui se produisent dans le courant d'une fermentation.

Les variations de l'acide succinique, produit normal de la fermentation alcoolique, étant les plus intéressantes à étudier, c'est avec lui que nous avons fait le plus d'essais.

En étudiant maintenant les variations constatées dans l'acidité totale, fixe et volatile, nous pouvons nous rendre facilement compte s'il y a augmentation ou diminution, et quel est le sens du phénomène.

Nous allons d'abord suivre ces variations dans un même ballon, mais dans des liquides différents additionnés de quantités variables d'acide succinique, ou laissés sans addition d'aucun acide, et avec ce cas n'ayant que les acides produits par la fermentation : acide succinique et acide acétique.

1^{re} EXPÉRIENCE. — Ensemençons de l'eau de touraillons à 10 0/0 de saccharose, additionnée ou non d'acide succinique, avec une même levure de vin et faisons des prises dans ces deux ballons après 24, 78, 119 jours.

	Ballon sans addition d'acide succinique.	Ballon addi- tionné d'ac. succinique.
Acidité totale à la fin de la 1 ^{re} fermentation.	1,245	3,931
Diminution après 24 jours.....	0,193	0,202
— — 78 —	0,334	1,063
— — 119 —	0,210	1,614
Acidité fixe à la fin de la 1 ^{re} fermentation ..	1,130	3,583
Diminution après 24 jours.....	0,135	0,161
— — 78 —	0,254	0,780
— — 119 —	0,155	1,314
Acidité volatile à la fin de la 1 ^{re} fermentation.	0,115	0,351
Diminution après 24 jours.....	0,068	0,041
— — 78 —	0,080	0,283
— — 119 —	0,053	0,297
Variation centésimale de l'acidité fixe.....	13,71	36,67
— — — volatile..	47,82	84,61

Nous constatons dans les deux ballons une diminution progressive des trois acidités : cette diminution est bien plus forte dans le ballon qui a reçu de l'acide succinique à l'origine ; il semble même se former des acides fixes et des acides volatils dans le ballon non additionné d'acide succinique, à la fin de l'expérience.

2^e EXPÉRIENCE. — Ensemençons maintenant deux autres ballons contenant de l'eau de levure à 10 0/0 de saccharose avec une levure de vin. L'un A reste sans acide, l'autre D est additionné d'acide succinique à l'origine ; le

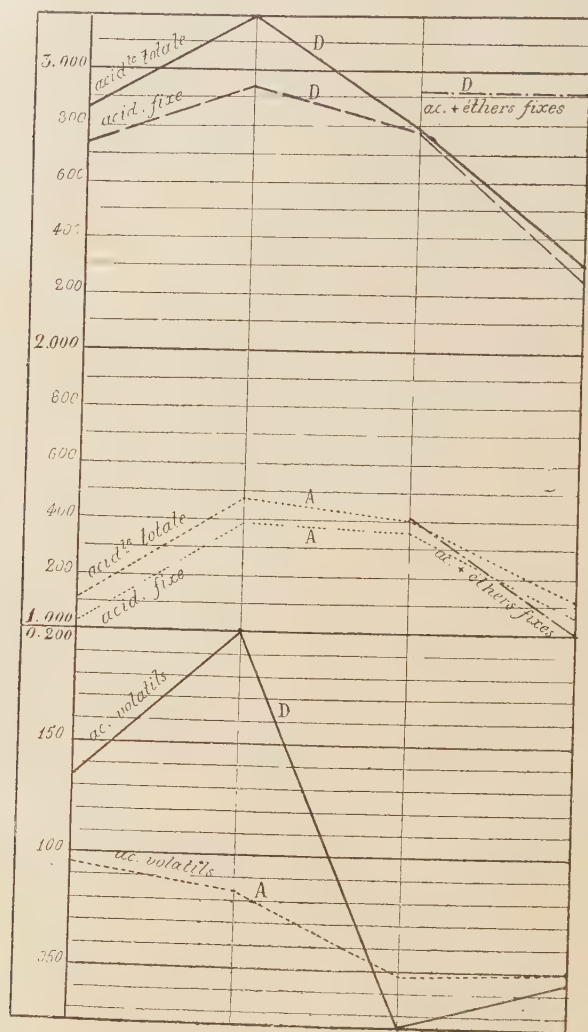


Fig. 1.

tableau suivant et les courbes de la figure 1 nous renseignent sur les variations des divers acides ; on y trouve également pour la fin de l'expérience la somme des acides fixes et éthers fixes ; la figure 2 représente les courbes des variations d'acidité dans deux autres ballons B et F, le premier additionné à la 2^e prise d'acide acétique, le second F d'acide succinique.

Acidité totale à la fin de la 1 ^{re} fermentation.			
Variation après	46 jours		
—	95	—	
—	109	—	
—	150	—	

Ballon A.	Ballon B.
1,130	2,860
+ 0,340	+ 0,340
+ 0,278	— 0,065
— 0,115	»
»	— 0,555

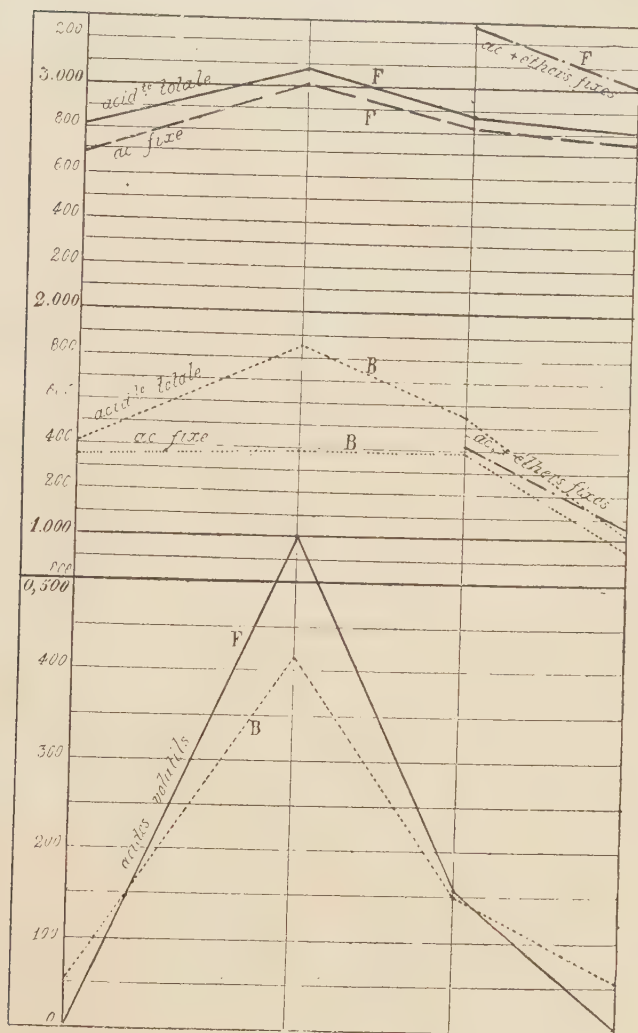


Fig. 2.

Acidité fixe à la fin de la 1 ^{re} fermentation..			
Variation après	46 jours		
—	95	—	
—	109	—	
—	150	—	

Ballon A.	Ballon B.
1,034	2,722
+ 0,353	+ 0,272
+ 0,326	+ 0,046
— 0,069	»
»	— 0,461

Acidité volatile à la fin de la 1 ^{re} fermentation.	0,096	0,138
Variation après 46 jours.....	— 0,013	+ 0,068
— — 93 —	— 0,048	— 0,111
— — 109 —	— 0,046	»
— — 150 —	»	— 0,094
Variation centésimale de l'acidité fixe.....	6,67	16,93
— — — volatile...	47,91	68,41

Les variations centésimales de l'acidité volatile ressemblent à celles trouvées avec l'eau de touraillons ; par contre les variations centésimales de l'acidité fixe sont bien plus faibles pour une durée moyenne de 120 jours. Ceci nous montre l'influence du milieu, la levure ensemencée étant la même pour les deux expériences ; la somme des acides fixes et des éthers fixes va en diminuant entre la 3^e et la 4^e prise dans les quatre ballons.

Ces deux expériences nous montrent que l'acidité fixe et volatile diminuent en présence de la levure, dans des proportions variables avec le milieu de culture et les conditions de l'expérience.

Passons maintenant en revue toutes les influences extérieures qui modifient la nutrition de la levure. Nous allons retrouver de nombreuses variations qui rappellent celles qu'on trouve pour le pouvoir ferment d'une levure.

A) *Influence de la race de levure.* — Toutes les levures ne se ressemblent pas. Elles ne transforment pas toutes avec la même facilité une même quantité de sucre en alcool et en acide carbonique ; elles ne produisent pas, toutes choses égales d'ailleurs, les mêmes proportions de glycérine, d'acide succinique, d'acides volatils, et nous allons voir qu'elles ne font pas disparaître avec la même vitesse les acides qu'elles trouvent dans les liquides. Citons à cet effet quelques expériences.

1^{re} EXPÉRIENCE. — Deux levures de vin, 6 et B, ont été ensemencées dans

l'eau de touraillons, sucrée à 4 0/0 et additionnée de 6 grammes d'acide tartrique par litre ; voici les variations constatées pour les acidités.

	Levure 6.	Levure B.
Acidité totale à la fin de la fermentation..	7,49	8,76
Variation après 7 semaines.....	— 0,49	— 1,59
Acidité fixe à la fin de la fermentation...	6,69	8,04
Variation après 7 semaines.....	— 0,15	— 3,14
Acidité volatile à la fin de la fermentation.	0,64	0,58
Variation après 7 semaines.....	— 0,27	— 0,36
Diminution centésimale de l'acidité fixe...	2,2 0/0	44,2 0/0
— — — volatile.	43 0/0	62 0/0

La levure B fait donc disparaître beaucoup plus d'acidité que la levure 6 : la différence est surtout sensible avec les acides fixes ; ces variations ne peuvent, en effet, pas s'expliquer par des proportions variables d'éthers formés, à moins d'admettre *a priori* des productions de glycérine variant dans le rapport de 1 à 3 pour les deux levures 6 et B.

2^e EXPÉRIENCE. — Du jus de raisin a été ensemencé avec diverses levures et analysé après 15 jours, 3 mois et 5 mois.

	Levure 4	Levure 7	Levure 16	Levure 35
Acidité totale à la fin de la fermentation.....	6,36	5,54	5,63	6,24
Variation après 90 jours.....	— 0,13	— 0,58	— 0,84	— 1,08
— — 150 —.....	— 1,24	— 1,17	— 0,15	— 0,87
Acidité fixe à la fin de la fermentation.....	6,19	5,14	5,37	5,88
Variation après 90 jours.....	— 0,02	— 0,27	— 1,05	— 0,84
— — 150 —.....	— 1,11	— 0,83	— 0,16	— 0,57
Acidité volatile à la fin de la fermentation.....	0,14	0,32	0,22	0,29
Variation après 90 jours.....	— 0,09	— 0,25	+ 0,16	— 0,19
— — 150 —.....	— 0,41	— 0,27	— 0,01	— 0,25
Diminution centésimale finale de l'acidité fixe.....	17,8	16,1	2,8	9,7
Diminution centésimale finale de l'acidité volatile.....	82	85	4	83

Nous constatons une diminution progressive et sensiblement pareille de l'acidité fixe et volatile pour les deux levures 4 et 7 ; par contre l'acidité passe par des oscillations plus ou moins fortes pour les deux autres levures. Faut-il y voir un caractère physiologique, ou peut-on attribuer cette grande différence à des phénomènes d'éthérification ? Contentons-nous pour le moment de la signaler et de dire que la levure 6 montre, en général, des diminutions suivies d'augmentation d'acidité, c'est-à-dire que les ballons ensemencés avec cette levure passent par des oscillations souvent très fortes dans la dose des divers acides fixes et volatils.

3^e EXPÉRIENCE. — Du moût de raisin, avec 8^{gr},51 d'acidité par litre, est ensemencé avec les deux levures de vin 4 et 16 ; aussitôt que la 1^{re} fermentation est terminée, on fait une première prise et on abandonne les matras à la température de 25° de l'étuve ; la 2^e prise a été faite après 90 jours et la 3^e prise après 110 jours.

d'acidité variable, on trouve que les liquides fermentés contiennent des acidités variables avec le moût primitif et avec la levure employée ; le rang occupé par chaque levure varie d'un moût à l'autre. Considérons les résultats constatés avec différents milieux au point de vue de la dose et la nature de l'acide.

1^{re} EXPÉRIENCE. — Lorsqu'on ensemente avec une même levure de l'eau de touraillons ou de l'eau de levure sucrée et additionnée de quantités à peu près équivalentes d'acide tartrique, ou d'acide malique, ou d'acide citrique, et qu'on abandonne les liquides fermentés en présence de la levure, on voit que les acidités totales et volatiles diminuent régulièrement ; nous laissons de côté les acidités fixes, en raison des incertitudes qui affectent le dosage lorsque plusieurs acides fixes se trouvent en présence ; le ballon A a reçu de l'acide tartrique, le ballon B de l'acide malique et le ballon C de l'acide citrique.

	A	B	C
Acidité totale à la fin de la 1 ^{re} fermentation.....	6,290	4,980	5,890
Diminution après 93 jours.....	— 0,820	— 0,780	— 0,490
Acidité volatile à la fin de la 1 ^{re} fermentation.....	0,275	0,164	0,206
Diminution après 93 jours.....	— 0,226	— 0,143	— 0,185
Variation centésimale de l'acidité totale.....	— 13 0/0	— 15 0/0	— 8,3 0/0
Variation centésimale de l'acidité volatile.....	— 82,2	— 87,2	— 89,8

La disparition des acides totaux est la plus forte dans le ballon B, soit parce que là il y a plus d'acide succinique, soit encore parce que l'acide malique est plus facilement brûlé que les deux autres acides.

Il est fort probable qu'il existe pour chaque acide une dose optima pour laquelle la diminution de l'acidité atteint, avec une levure donnée, un maximum.

Voyons maintenant comment une même levure se comporte dans le même milieu avec diverses doses d'un même acide.

2^e EXPÉRIENCE. — On ensemente de l'eau de touraillons à 3 0/0 de saccharose, additionnée d'un demi-équivalent ou d'un équivalent et demi d'acide tartrique par litre environ, avec une levure de vin. On fait une première analyse et on abandonne les ballons pendant 13 semaines à l'étuve.

	Dose 1/2 AT.	1 1/2 AT.
Acidité totale à la fin de la 1 ^{re} fermentation...	4,48	13,16
Diminution après 90 jours.....	— 0,20	— 0,31
Acidité volatile à la fin de la 1 ^{re} fermentation...	0,61	0,80
Diminution après 90 jours.....	— 0,60	— 0,39
Variation centésimale de l'acidité totale.....	— 4,4	— 2,3
Variation centésimale de l'acidité volatile.....	— 98,6	— 48,8

Cette expérience nous apprend que les diminutions absolues et centésimales des acides fixes et volatils sont plus élevées avec la dose faible d'acide tartrique à l'origine; dans une autre expérience, l'acide citrique s'est comporté comme l'acide tartrique.

Prenons enfin un milieu plus complexe, le jus de raisins, et voyons ce qui s'y produit :

3^e EXPÉRIENCE. — Deux jus de raisin A et B, ayant à l'origine une acidité totale de 12^{gr},54 et de 8^{gr},5 par litre exprimées en acide tartrique, sontensemencés avec la levure de vin 1; après la première analyse, les ballons sont abandonnés pendant 110 jours à la température de 25°.

	A	B
Acidité totale à la fin de la 1 ^{re} fermentation...	12,62	10,42
Variation après 110 jours.....	— 4,65	— 2,22
Acidité fixe à la fin de la 1 ^{re} fermentation....	12,26	10,11
Variation après 110 jours.....	— 1,27	— 1,97
Acidité volatile.....	0,29	0,25
Variation après 110 jours.....	— 0,23	— 0,20
Variation centésimale de l'acidité fixe.....	10,3	19,5
Variation centésimale de l'acidité volatile.....	77,4	80,0

C'est donc encore dans le moût le moins acide que l'acidité a diminué le plus; mais le jus de raisin est un milieu fort complexe; il renferme, à côté de l'acide tartrique, d'autres acides fixes, en plus ou moins grande proportion: je n'ai pas recherché si c'était l'acide tartrique ou l'acide succinique qui avait surtout disparu, soit comme acide ou comme éther.

B) *Acides volatils. Acide acétique.* — Le plus important parmi les acides volatils est l'acide acétique, produit constant de toute fermentation alcoolique: nous savons qu'il disparaît plus rapidement que les acides fixes et dans des proportions d'autant plus fortes que les doses en sont plus élevées.

1^{re} EXPÉRIENCE. — Ensemençons avec une levure de vin deux ballons contenant de l'eau de levure sucrée et additionnée d'acide succinique; lorsque la première fermentation est terminée, ajoutons de l'acide acétique dans le ballon B; voici comment se sont comportés ces deux ballons, lors des différentes prises.

	A	B
Acidité totale au début.....	6,220	6,590
Diminution après 93 jours.....	— 1,080	— 1,430
Acidité fixe au début.....	6,026	5,743
Diminution après 93 jours.....	— 0,918	— 0,713
Acidité volatile au début.....	0,194	0,847
Diminution après 93 jours.....	— 0,162	— 0,718
Variation centésimale de l'acidité fixe.....	15,23	12,41
Variation centésimale de l'acidité volatile ..	83,50	84,63

L'addition d'acide acétique semble retarder la disparition des acides fixes, tandis que l'acidité volatile disparaît à peu près dans la même proportion, mais le milieu de culture et la levure interviennent encore ici, comme le montre l'expérience suivante :

2^e EXPÉRIENCE. — Les ballons A avaient à l'origine une acidité volatile de 90 milligrammes, les ballons B de 1090, c'est-à-dire 1 gr. de plus; l'expérience a également duré 90 jours.

	Ballons A.			Ballons B.		
	Lev. e.	16	71	e.	16	71
Diminution centésimale de l'acidité fixe.....	68,3	23,2	34,9	42,1	23,2	27,7
Diminution centésimale de l'acidité volatile.....	41	27	62	93,4	92,2	97,7

On pouvait se demander quelle était l'influence des produits formés pendant la fermentation, parmi lesquels l'acide acétique et les éthers ont un rôle spécial; pour le voir, il fallait donc les éliminer, enlever tout le liquide d'une fermentation, laisser la levure et y verser une quantité égale de liquide nutritif non fermenté, non sucré, mais additionné d'une quantité d'acides fixes et volatils égale à celle qui a été enlevée. En comparant des ballons pareils, l'un dans lequel on a fait une première prise, l'autre qui a reçu du liquide neuf, on trouve dans ce dernier une légère augmentation de l'acidité fixe suivie ensuite d'une diminution de cette acidité; l'acidité volatile diminue constamment dans les deux ballons, la diminution centésimale approche de 90 à 93 0/0.

Si la proportion de levure jeune est forte, la disparition des acides peut être complète, comme nous le montre l'expérience suivante.

On siphonne le liquide d'une fermentation alcoolique (400 c. c.) aussitôt que la première fermentation est finie, et on remplace par 150 c. c. d'eau de touraillons acidulée en acide succinique et acide acétique; le ballon A reçoit de plus 3 c. c. d'alcool à 95°; on abandonne à l'étuve pendant 60 jours.

L'observation journalière nous a montré que la levure mène une vie aérobie et forme voile à la surface.

	A l'origine.		Après 60 jours.	
	A	B	A	B
Acidité totale.....	4,337	1,437	0,085	0,122
— volatile.....	0,442	0,442	0,010	0,008
— fixe.....	0,896	0,995	0,076	0,039

Les acides avaient donc presque complètement disparu; car il n'y avait que 20 milligrammes d'éthers totaux dans le ballon A et 60 dans le ballon B.

Il pouvait être utile de voir comment se comporteraient les divers acides volatils, les plus communément trouvés dans les liquides fermentés : acide formique, acide propionique et acide butyrique.

Dans ce but, j'ai ajouté aux liquides fermentés, laissés en présence de la levure, des quantités déterminées de ces divers acides, que l'on a dosés par la méthode des distillations fractionnées de M. Duclaux.

Acide formique. — Cet acide, qui se forme dans beaucoup de circonstances, n'apparaît, en général, que très rarement dans les liquides de culture on peut se demander s'il est toujours absent, et si la levure ne peut en former dans certaines conditions.

M. Khoudabachian a trouvé de l'acide formique dans les raisins secs et de très faibles traces dans les moûts naturels.

Des essais faits avec diverses levures et dans divers milieux de culture, aux températures de 10°, 25° et 35°, m'ont montré la formation d'acide formique, en proportion variable avec la température et avec la levure employée; nous savons, aussi, par les expériences de M. Duclaux, que les levures peuvent brûler cet acide, si la dose ne dépasse pas 0 gr. 4 par litre; dès lors on n'a qu'à ajouter une solution d'acide formique dans le liquide fermenté et voir ce qu'il devient.

Je me contenterai de montrer les résultats fournis avec la levure de vin 9.

Acidité volatile au départ.	{	A. Acétique	0,758
		A. Formique.....	0,317
Variations après 60 jours.	{	A. Acétique	0,870
		A. Formique	0,230
Variations après 135 jours.	{	A. Acétique	0,644
		A. Formique.....	0,053
Variation centésimale après 135 jours.	{	A. Acétique	27,4
		A. Formique	83,0

L'acide formique disparaît donc avant l'acide acétique, et il disparaît beaucoup plus rapidement à l'étuve (25°) qu'à la température de 10°.

Acide propionique et acide butyrique. — Il existe des levures qui brûlent l'acide propionique en notables proportions ; d'autres le laissent intact.

De plus on remarque qu'avec telle levure, la présence de cet

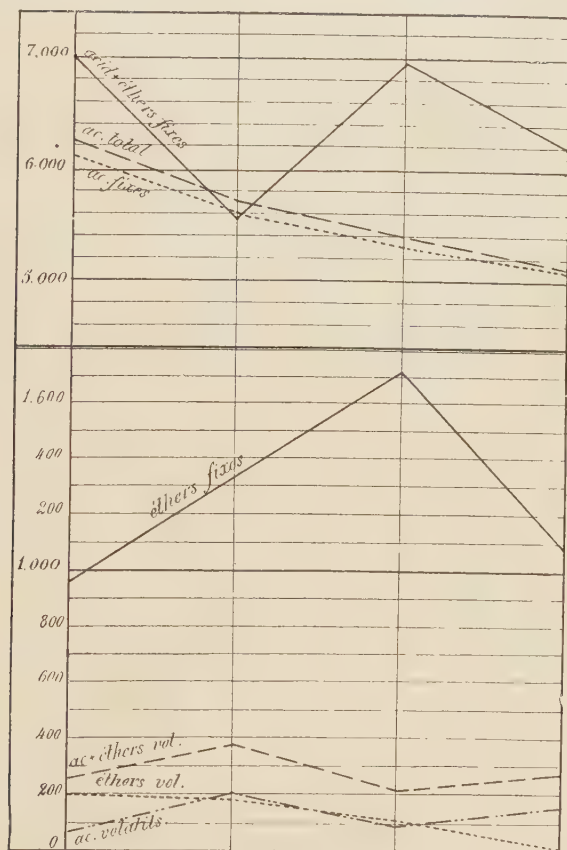


Fig. 3.

acide favorise la disparition de l'acide succinique, pour telle autre la disparition de l'acide acétique.

La levure n'attaque que faiblement l'acide butyrique : en sa présence l'acide acétique disparaît vite. On peut se demander si l'addition d'acide butyrique à un liquide ne change pas le mode de vie des levures ; leur vitalité ne diminue pas en présence de 0 gr. 2 d'acide butyrique par litre : il convient, en

outre, de signaler qu'avec l'acide butyrique on trouvait, à la dernière prise de la distillation, de notables quantités d'acide valérianique, bien supérieures à celles trouvées dans l'acide butyrique employé.

En résumé, nous avons vu que les acides peuvent disparaître

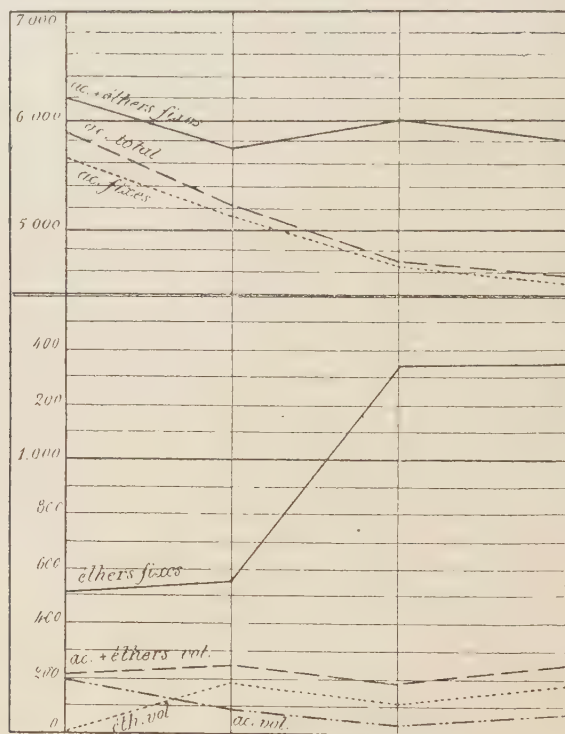


Fig. 4.

en proportions plus ou moins fortes selon le milieu considéré; une partie est brûlée, une autre passe à l'état d'éthers.

D. Influence de la matière azotée. — L'addition de peptone à un milieu de culture favorise, en général, le développement de la levure, et dès lors on peut à prévoir une disparition plus rapide des acides fixes et volatils; voyons si l'expérience confirme ces prévisions.

1^{re} EXPÉRIENCE. — Ensemençons de l'eau de levure à 100/0 de saccharose, acidulée à l'acide succinique (ballon A), et additionnée, en outre, de 0,50/0 de peptone (ballon P); faisons des prises à différents moments dans les deux

ballons, et étudions ainsi la disparition des acides fixes et volatils. Représentons de même par des courbes les variations constatées pour le ballon A fig. 3, ballon P fig. 4; enfin, donnons aussi le graphique d'un autre

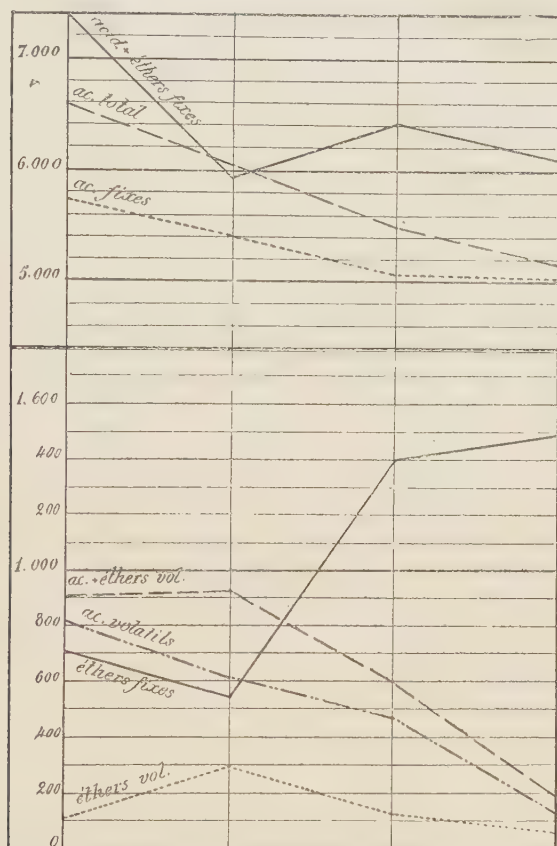


Fig. 5.

ballon B (fig. 5), semblable aux ballons A et P, mais ayant reçu, peu après la première prise, une dose d'acide acétique. On voit que les courbes d'un même élément ont la même allure générale dans les trois ballons; nous parlerons plus loin des éthers formés.

	A	P
Acidité totale à la fin de la 1 ^{re} fermentation...	6,220	5,890
Diminution après 27 jours.....	0,510	0,650
— 53 jours.....	0,790	1,190
— 93 jours.....	1,080	1,320
Acidité fixe à la fin de la 1 ^{re} fermentation....	6,026	5,688
Diminution après 27 jours.....	0,504	0,524

Diminution après 53 jours.....	0,705	1,024
— 93 jours.....	0,948	1,187
Acidité volatile à la fin de la 1 ^{re} fermentation...	0,194	0,202
Diminution après 27 jours.....	0,006	0,126
— 53 jours.....	0,085	0,166
— 93 jours.....	0,162	0,133
Variation centésimale de l'acidité fixe.....	15,23	20,86
Variation centésimale de l'acidité volatile....	83,50	65,84

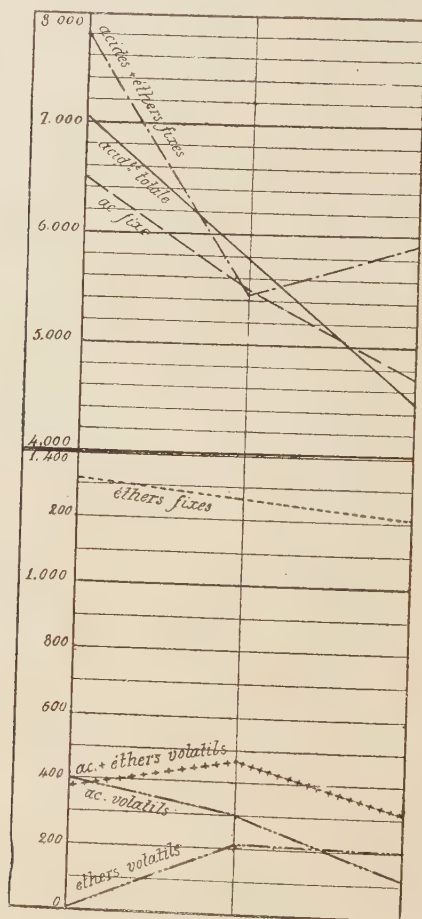


Fig. 6.

L'expérience nous apprend que l'addition de peptone fait disparaître l'acidité fixe plus rapidement, et l'acidité volatile plus lentement.

Dans une seconde expérience faite avec de l'eau de levure, voici les variations centésimales trouvées :

	Ballon sans peptone. F.	Ballon avec 0,5 % peptone. F.
Diminution centésimale de l'acidité fixe après 13 semaines.....	— 27,9	— 63,9
Diminution centésimale de l'acidité volatile après 13 semaines.....	— 69,0	— 67,7

Nous constatons une diminution très forte de l'acidité fixe (acide succinique); il convient d'ajouter qu'à la suite de la deuxième prise, il s'est formé dans le ballon additionné de peptone, une abondante multiplication de levure qui a formé voile et dès lors a détruit très vite l'acidité existante; la figure 6 nous montre la variation des divers éléments dans le ballon F depuis la première prise jusqu'à la dernière qui a eu lieu après 13 semaines,

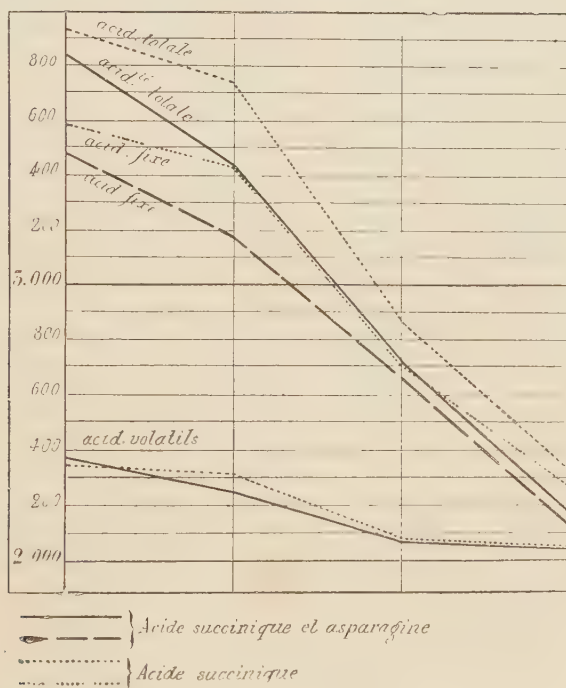


Fig. 7.

2^{me} EXPÉRIENCE. — Étudions maintenant l'influence de l'asparagine; prenons de l'eau de touraillons à 10 0/0 de saccharose, acidulée à l'acide succinique (ballon A) et additionnée, en outre, de 0,5 0/0 d'asparagine (ballon B); faisons, comme d'habitude, les prises aux différents moments; les résultats sont transcrits par les courbes de la figure 7 et indiqués dans le tableau suivant.

	A	B
Acidité à la fin de la 1 ^{re} fermentation.....	3,934	3,835
Diminution après 24 jours.....	0,202	0,408
— 78 jours.....	1,063	1,109
— 119 jours.....	1,611	1,656
Acidité fixe à la fin de la 1 ^{re} fermentation....	3,583	3,467
Diminution après 24 jours.....	0,161	0,293
— 78 jours.....	0,789	0,806
— 119 jours.....	1,314	1,330
Acidité volatile à la fin de la 1 ^{re} fermentation...	0,351	0,368
Diminution après 24 jours.....	0,041	0,115
— 78 jours.....	0,283	0,303
— 119 jours.....	0,297	0,326
Variation centésimale de l'acidité fixe.....	36,67	38,36
Variation centésimale de l'acidité volatile....	84,61	88,58

Cette expérience nous montre que l'addition d'asparagine n'a que très faiblement influencé la disparition des acides fixes et volatils.

Il resterait à voir l'influence de l'addition de phosphate d'ammoniaque. Nous ferons connaître, M. Dienert et moi, dans un travail spécial, les résultats obtenus sur ce point; je me bornerai à dire que, dans les milieux phosphatés, l'acidité augmente bien plus longtemps que dans les milieux non phosphatés : et ce n'est qu'au bout d'un temps assez long qu'on observe des diminutions; la température, la dose de phosphate et la nature de l'acide jouent ici un grand rôle.

D'une façon tout à fait générale, nous pouvons donc dire que la nature de l'élément azoté intervient très nettement dans la variation des acidités des boissons fermentées.

E) Influence de l'éducation reçue par la levure. — On sait que les levures peuvent conserver pendant quelque temps certains caractères acquis par éducation, et l'on pouvait se demander si des levures habituées par diverses générations successives à certains corps (phosphates, fluorures, acides) ne se comporteraient pas différemment des levures non traitées.

Voici les résultats constatés : une levure habituée à vivre dans un milieu acidulé à l'acide tartrique a fait disparaître les acides fixes un peu plus rapidement : quant aux acides volatils elle ne montrait aucune différence avec la levure non traitée.

On peut faire les mêmes remarques pour une levure habituée à vivre dans des solutions phosphatées.

Enfin, une levure habituée au fluorure d'ammonium fait disparaître plus rapidement les acides volatils et moins vite les acides fixes, soit que ces acides soient moins vite brûlés en

réalité, ou que la levure traitée produise plus d'acide succinique.

Mais en résumé nous pouvons dire que l'éducation des levures n'intervient que très faiblement au point de vue qui nous occupe.

F. Influence de l'air. — Pendant longtemps la disparition de l'acidité des vins a été considérée comme un simple phénomène chimique dû à l'action de l'oxygène; comme cet oxygène pénètre difficilement dans les vases vinaires et les bouteilles, la combustion devait être lente.

Schukow est venu nous apprendre qu'il pouvait y avoir un phénomène biologique, en montrant que l'aération n'agissait pas de la même façon dans les milieux pauvres ou riches en principes azotés.

L'aération peut avoir pour effet d'augmenter la multiplication de la levure, et il peut ainsi en résulter indirectement une plus forte diminution de l'acidité; l'observation montre d'ailleurs que la diminution est la plus forte là où la levure mène le plus facilement la vie aérobie; les levures restant attachées au fond des vases font disparaître beaucoup moins d'acidité.

Aération ou quantité de levure agissent alors dans le même sens; signalons quelques expériences à l'appui de ce que nous venons dire.

1^{re} Expérience. — Ensemençons de l'eau de touraillons sucrée contenue, d'une part, dans un vase plat et large, facilitant l'accès de l'air, d'autre part dans un tube de 80 centimètres de long. Aussitôt la première fermentation terminée, faisons une prise et abandonnons ensuite pendant trois mois.

	Culture en surface.	Culture en profondeur.
Acidité totale à la fin de la 1 ^{re} fermentation.....	7,62	7,75
Variation après 90 jours.....	— 0,28	— 0,14
Acidité fixe à la fin de la 1 ^{re} fermentation.....	7,40	7,53
Variation après 90 jours.....	— 0,12	— 0,10
Acidité volatile à la fin de la 1 ^{re} fermentation.....	0,176	0,172
Variation après 90 jours.....	— 0,126	— 0,032
Variation centésimale de l'acidité fixe.....	1,7	1,3
Variation centésimale de l'acidité volatile.....	72	49

En présence de l'air, la diminution des deux acidités est donc activée, l'acidité fixe ne montre que de faibles variations; par contre l'acidité volatile a disparu dans de fortes proportions dans la culture en surface.

2^e *Expérience*. — On ensemente du jus de raisin avec deux levures de vin 16 et 18; à la fin de la première fermentation on agite bien les ballons et on fait une prise de la moitié du liquide de chaque ballon; on fait l'analyse et on fait passer tout le reste à travers une bougie Chamberland flambée; on recueille dans des ballons flambés analogues à ceux qui ont conservé la moitié du liquide, en présence de la levure: ces deux ballons sont bouchés au coton comme les premiers, on pèse ensuite les ballons et on les abandonne pendant 2 mois $4\frac{1}{2}$ à 23°, on les ramène au poids primitif avec l'eau distillée et on analyse.

	Levure 16.	Levure 18.
Acidité totale à la fin de la fermentation.....	4,01	3,98
Variation après 75 jours en présence de levure.	— 0,12	— 0,48
Variation après 75 jours en présence de l'air seul.....	— 0,06	— 0,09
Acidité fixe à la fin de la fermentation.....	3,59	3,80
Variation après 75 jours en présence de levure.	+ 0,14	— 0,31
Variation après 75 jours en présence de l'air seul.....	— 0,02	— 0,05
Acidité volatile à la fin de la fermentation....	0,335	0,140
Variation après 75 jours en présence de levure.	— 0,206	— 0,135
Variation après 75 jours en présence de l'air seul.....	— 0,034	— 0,028
Variation centésimale de l'acidité fixe en présence de levure.....	+ 3,9	— 8,2
Variation centésimale de l'acidité fixe en présence d'air seul.....	— 0,7	— 1,3
Variation centésimale de l'acidité volatile en présence de levure.....	— 62	— 96
Variation centésimale de l'acidité volatile en présence d'air seul.....	— 10	— 20

Cette expérience nous apprend que l'air n'intervient dans la disparition des acides que très faiblement; il agit surtout en favorisant la vie aérobie de la levure, les quantités de tartre étaient exactement les mêmes dans les deux ballons correspondant à la même levure.

3^e *Expérience*. — Nous avons déjà cité une expérience où la disparition des acides était pour ainsi dire complète, grâce à une forte quantité de levure et grâce à l'arrivée facile de l'air: l'expérience suivante viendra la confirmer et nous montrer que c'est surtout l'acide succinique qui disparaît facilement.

On a réparti, entre une série de tubes et de vases coniques, de la levure, en quantité suffisante pour occuper plusieurs centimètres dans les tubes; on verse ensuite dans ces tubes et les vases coniques 50 c. c. d'eau de touraillon additionnée d'acide tartrique, ou d'acide malique, ou d'acide succinique, et on abandonne pendant 5 semaines à l'étuve; il y a toujours 2 tubes et 2 vases pour un même acide, c'est-à-dire peu d'air et beaucoup d'air en présence d'un poids de levure sensiblement le même.

POUR LES 50 C. C.

	Acidité à l'origine.		Acidité après 5 semaines.	Ethers totaux.
Acide tartrique.....	0,297	Tube 1...	0,270	
		— 2...	0,275	
		Vase 1...	0,267	
		— 2...	0,268	
Acide malique.....	0,268	Tube 1...	0,142	
		— 2...	0,125	
		Vase 1...	0,116	
		— 2...	0,115	
Acide succinique.....	0,280	Tube 1...	0,248	0,026
		— 2...	0,251	0,014
		Vase 1...	0,072	0,052
		— 2...	0,060	0,067

La disparition de l'acide tartrique est pour ainsi dire nulle; l'acide malique disparaît aussi facilement en tubes qu'au large contact de l'air, enfin l'acide succinique disparaît surtout lorsque l'air est en suffisante quantité dans le vase de culture.

G. Influence de la température. — Nous savons que les diverses levures produisent des quantités variables d'acide succinique et d'acides volatils selon la température à laquelle a lieu la fermentation (10°, 25° ou 35°). Il était à prévoir qu'elles se comporteraient également d'une façon différente vis-à-vis des acides présents dans le liquide; c'est ce que l'expérience a confirmé.

1^{re} Expérience. — On ensemence de l'eau de touraillons à 10 0/0 de saccharose, additionnée d'acide succinique, avec une levure de vin: aussitôt que le dégagement gazeux cesse, faisons une première analyse: abandonnons ensuite la moitié des ballons à l'étuve (25°), l'autre moitié à la cave (8 à 10°) pendant 9 semaines.

La différence maxima constatée pour l'acidité totale des ballons de l'étuve était de 4 centigrammes, tandis que ceux de la cave concordaiént d'une façon remarquable: aussi pourrions-nous nous contenter des résultats d'un ballon de chaque série.

	Etuve	Cave.
Acidité totale à l'origine.....	6,313	6,350
Variation après 9 semaines.....	— 1,095	— 0,594
Acidité fixe à l'origine.....	6,061	6,090
Variation après 9 semaines.....	— 0,978	— 0,429
Acidité volatile à l'origine.....	0,252	0,260
Variation après 9 semaines.....	— 0,120	— 0,163
Variation centésimale de l'acidité fixe.....	— 16,5	— 7,0
Variation centésimale de l'acidité volatile.....	— 48,9	— 61,1

Nous voyons qu'à la cave la disparition des acides volatils est plus élevée qu'à l'étuve; c'est l'inverse pour les acides fixes (acide succinique).

En est-il encore ainsi lorsque la dose des acides volatils a été portée à un taux plus élevé par l'addition d'acide acétique?

	Étuve.	Cave.
Acidité totale à la fin de la 1 ^{re} fermentation....	8,073	8,073
Variation après 9 semaines.....	— 1,229	— 0,679
Acidité fixe à la fin de la 1 ^{re} fermentation....	6,061	6,070
Variation après 9 semaines.....	0,691	0,384
Acidité volatile à la fin de la 1 ^{re} fermentation....	2,012	2,022
Variation après 9 semaines.....	— 0,538	— 0,305
Variation centésimale de l'acidité fixe.....	— 11,4	— 6,3
Variation centésimale de l'acidité volatile.....	— 26,7	— 15,0

Nous voyons d'abord que la disparition des acides fixes est moins rapide, ce que nous savions déjà; de plus qu'il existe, entre les nombres fournissant la variation centésimale pour les ballons de l'étuve et ceux de la cave, sensiblement le même rapport que dans l'expérience précédente; la diminution des acides volatils se fait également moins vite dans les deux ballons; elle est un peu plus forte dans les ballons placés à l'étuve, mais ceci peut s'expliquer par l'éthérification qui certes est plus forte à l'étuve qu'à la cave.

2^e *Expérience*. — Ensemençons la levure de vin 1 dans l'eau de touraillons à 50/0 de saccharose et additionnée de 50/00 d'acide malique; la moitié des ballons est maintenue à 25°, l'autre moitié à 35°, l'acidité totale et fixe sont exprimées en acide succinique.

	à 25°	à 35°
Acidité totale à la fin de la fermentation.....	5,04	4,71
Variation après 20 jours.....	— 0,65	— 0,39
— 35 jours.....	— 0,84	— 0,98
Acidité fixe à la fin de la fermentation.....	4,87	4,55
Variation après 20 jours.....	— 0,63	— 0,38
— 35 jours.....	— 0,71	— 0,92
Acidité volatile à la fin de la fermentation....	0,16	0,14
Variation après 20 jours.....	— 0,02	— 0,01
— 35 jours.....	— 0,12	— 0,05
Diminution centésimale finale de l'acidité fixe...	14,4	20,3
Diminution centésimale finale de l'acidité volatile	78	33,8

L'étude de l'influence de la température, dans les limites où la levure ne souffre pas, montre que la diminution des acides fixes libres est d'autant plus forte que la température est plus élevée; quant aux acides volatils, leur disparition passe par un maximum, la diminution est, en effet, moindre à 10° et à 35° qu'à 25°.

Mais, comme nous l'avons déjà dit, la température intervient surtout dans le phénomène de l'éthérification, et c'est par l'étude de cette influence que nous allons terminer ce travail.

H. Influence de l'éthérification. — Les expériences que nous avons passé en revue nous ont montré que l'acidité des liquides alcooliques laissés en présence de levures diminue plus ou moins rapidement, selon les conditions de l'expérience et selon la levure employée.

La proportion des acides volatils détruits ou disparus comme acides est beaucoup plus grande que celle des acides fixes, ce qui peut s'expliquer en un certain sens parce que ces acides volatils sont en quantités plus faibles; mais si l'on considère les quantités absolues, le poids d'acides fixes disparus dépasse celui des acides volatils.

On peut se demander jusqu'à quel point l'éthérification intervient dans le phénomène de la disparition des acides; c'est ce que j'ai essayé de voir en dosant les éthers formés dans quelques-unes de mes expériences. En faisant la somme des acides fixes et des éthers fixes, la somme des acides volatils et des éthers volatils aux différents moments d'une expérience, on avait une idée approximative de la marche du phénomène; je dis approximative, car d'une part nous avons vu qu'il pouvait y avoir augmentation d'acide fixe par suite de la formation d'acide succinique: de plus, dans le procès nutritif de la levure, il peut y avoir transformation de l'acide fixe en acide volatil, et on se trouve ainsi en présence d'une superposition d'effets très difficiles à démêler d'une façon précise.

Les figures 3, 4, 5, 6 nous montrent les variations trouvées dans différentes expériences. Complétons-les par quelques chiffres, ils nous diront que ces sommes calculées pour la fin de l'expérience, comparées à celles du début, sont en général inférieures, ce qui veut dire qu'il y a diminution réelle de l'acidité.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE — EAU DE LEVURE ADDITIONNÉE D'ACIDE SUCCINIQUE

	Début.	Après 3 mois.
Acides fixes calculés.....	6,486	4,678
Acides fixes trouvés à l'éther.....	3,738	4,398
Acides volatils.....	0,383	0,118
Ethers fixes.....	1,313	1,204
Ethers volatils.....	0,006	0,202
Somme des acides fixes calculés et des éthers fixes.	7,799	3,882
Somme des acides fixes trouvés et des éthers fixes.	7,051	3,598
Somme des acides volatils et des éthers volatils.....	0,389	0,320

DEUXIÈME EXPÉRIENCE — EAU DE LEVURE ADDITIONNÉE D'ACIDE SUCCINIQUE
ET DE PEPTONE

	Début.	Après 3 mois.
Acides fixes calculés	5,688	4,504
Acides fixes trouvés par l'éther.....	5,350	3,615
Acides volatils	0,202	0,069
Ethers fixes.....	0,515	1,353
Ethers volatils	0,011	0,179
Somme des acides fixes calculés et des éthers fixes.	6,203	5,854
Somme des acides fixes trouvés et des éthers fixes..	5,865	4,968
Somme des acides volatils et des éthers volatils	0,213	0,218

Les diminutions d'acidité trouvées par MM. Kulisch, Wortmann dans des bouteilles de vin doivent donc être attribuées pour une bonne part à l'éthérification.

On le prouve par l'expérience suivante : Faisons fermenter en matras Pasteur 20 c. c. de jus de raisins avec diverses levures ; prélevons à l'aide de pipettes flambées le liquide fermenté et versons la levure dans du vin rendu stérile par la filtration, à la bougie Chamberland : conservons alors ce vin dans des bouteilles préalablement stérilisées, entièrement remplies et bien bouchées qu'on abandonne ensuite à la cave : différents essais m'ont montré que dans ce cas la diminution de l'acidité est insensible.

Un vin ayant une acidité totale de 13^{gr},90 en acide tartrique et une acidité volatile de 0,214 a fourni les résultats suivants après 1 1/2 an de cave.

	Acidité totale.	Acidité volatile.	Éthers fixes.	Éthers volatils.
Vin témoin non filtré	9,862	0,379	2,140	0,403
Témoin filtré au Chamberland.	13,80	0,205	—	0,300
Ensemencé avec lev. 7 couché.	13,59	0,245	2,198	0,337
— — 83 —	13,22	0,222	2,067	0,333
— — 85 bouché au coton	11,89	0,186	2,391	0,365

L'acidité du témoin seule a varié, sans qu'il y ait des différences dans les éthers des divers vins; aucune des levures ensemencées n'a agi d'une façon efficace, peut-être parce que le milieu ne leur convenait guère, mais toutes étaient restées bien vivantes.

En serait-il de même dans des récipients où l'air pourrait pénétrer plus facilement ? Peut-être pourrait-on obtenir quelques résultats en ensemencant du moût de raisins acides, stérilisé préalablement, avec des levures sélectionnées, qui se seraient

ainsi habituées au début au milieu dans lequel on les prépare? C'est ce que seule l'expérience peut décider.

En résumé nous pouvons dire que la levure peut intervenir dans la disparition des acides, soit en les brûlant directement, soit encore indirectement en influant sur le phénomène de l'éthérification par l'alcool, la glycérine produits, etc.

Cette étude montre en outre combien tout ce qui se rattache aux levures et à la fermentation alcoolique, simple en apparence, peut changer d'allure par suite de circonstances souvent insignifiantes, de façon à rendre fort difficile l'explication des divers cas qui peuvent se présenter.

BIBLIOGRAPHIE

- PASTEUR. — Études sur les vins, 1866 et 1873.
 DUCLAUX. — Recherches sur les vins. *Annales de chimie et de physique*, 5^e série, 1874.
 NÄGELI. — Ernährung der niederen Pilze. *Sitzungsbericht der bayr. Akademie* 1879.
 GOETHE. — Disparition de l'acidité dans les cidres. *Jahresbericht für Gartenkunde und Botanik*, 1884.
 A. CZECH-MÜLLER-THURGAU. — *Weinbau u. Weinhandel*, 1888.
 KULISCH. — Über das Abnehmen der Säure in Obst und Traubenwein während der Gährung und Lagerung. *Weinbau u. Weinhandel*, 1889 et 1895.
 MÜLLER-THURGAU. — *Weinbau u. Weinhandel*, 1895.
 MEISSNER. — Mittheilung über Weinbau u. Kellerwirthschaft, 1896.
 SCHUKOW. — Über den Säureverbrauch der Hefen. *Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.* II Abth, 1896.
 WORTMANN. — Id. 1897, p. 96.
 KOCH. — XVI. Deutsch. Weinbaucongress, 1897.
 WORTMANN. — Wirkung lebender Organismen in fertigen Weinen, 1898.
 PORTELE ET MACH. — Même sujet, 1892.

REVUES ET ANALYSES

LE PROCÉDÉ D'ÉPURATION DES EAUX D'ÉGOUT

PAR LE

PROCÉDÉ DU SYNDICAT DES « RÉSERVOIRS SEPTIQUES »

D'EXETER ET DE WESTMINSTER

REVUE CRITIQUE

Tous les efforts tentés en vue de perfectionner les procédés d'épuration des eaux d'égout méritent d'attirer l'attention des hygiénistes. Les lecteurs de ces *Annales* connaissent le procédé de l'épandage tel qu'il est pratiqué dans la plupart des villes qui l'ont adopté. (Ces *Annales*, 1890.) M. Duclaux les a également mis au courant des expériences de M. Hiram Mills à la station expérimentale de Lawrence, dans le Massachusetts, sur l'épuration par les filtres artificiels. (Ces *Annales*, 1892.)

Le Syndicat des « Réservoirs septiques » d'Exeter a exposé au Palais du Génie civil, à l'Exposition universelle de 1900 à Paris, un appareil d'épuration qui dénote un effort vers une amélioration sur le procédé des filtres artificiels.

Les villes qui ne disposent pas de terrains perméables susceptibles d'être utilisés pour l'épandage pouvaient recourir au procédé de M. Hiram Mills. On sait que ce savant a montré que c'est le sable grossier qui réunit le mieux les conditions d'une bonne épuration. Les vides qui restent entre les éléments du sable doivent être suffisamment grands pour empêcher l'eau de se maintenir dans la masse par la force de la capillarité. On a observé en effet que les phénomènes d'oxydation s'atténuent ou s'arrêtent complètement au sein des liquides chargés de matières organiques. Un filtre d'épuration ne doit pas seulement être perméable à l'eau ; il faut qu'il le soit aussi à l'air libre, dans les intervalles du fonctionnement qui, toujours en vue d'une combustion active, doit être intermittent.

Un filtre ainsi constitué est capable, pour une profondeur de 2 mètres, d'épurer d'une façon très satisfaisante une épaisseur d'eau d'égout de 135 millimètres en 24 heures, ce qui correspond à un volume de 1,350 mètres cubes à l'hectare.

On conçoit cependant qu'il ne faudrait pas déverser, sur un pareil filtre, les eaux telles qu'elles sortent des égouts, avec la paille, le papier et autres matières grossières qu'elles entraînent. Les vides se combleraient en quelques jours par colmatage, et la circulation de l'air y serait rendue impossible. Il faut débarrasser les eaux d'égout de tous les détritux un peu volumineux qu'elles charrient ; de là un excès de travail et d'entretien permanents.

Le procédé d'Exeter tend à supprimer cet inconvénient. Les matières organiques solides, composées pour la plus grande partie de cellulose, peuvent en effet être gazéifiées par des procès biologiques ; et c'est le dispositif adopté en vue de réaliser cette partie très importante de l'épuration qui constitue au point de vue théorique l'innovation de cet appareil.

Les eaux sont reçues dans une petite chambre, dite chambre à gravier, dont le but est d'amortir le courant afin de permettre au sable de se déposer. De là elles passent, par une ouverture pratiquée au-dessous du niveau de l'eau, dans un grand réservoir clos en briques cimentées, appelé « Réservoir septique ». Le volume de ce réservoir est suffisant pour recevoir toutes les eaux déversées par les égouts en 24 heures ; celles-ci y séjournent donc 24 heures, et pendant ce temps elles laissent déposer toutes les matières qu'elles tiennent en suspension. Le réservoir doit être développé surtout suivant la longueur, de cette façon il s'y établit un courant insensible qui fait que l'eau affluente se présente au bout de 24 heures à l'orifice de sortie. En ce point, elle est opalescente, légèrement teintée de brun, mais presque entièrement dépourvue des matières solides en suspension.

Une conduite, dont l'ouverture est placée au-dessous du niveau des eaux, les conduit alors dans un filtre ouvert à l'air libre, conçu d'après les notions fournies par M. Hiram Mills. Ce filtre à une profondeur de 1^m,60 ; il est rempli de mâchefer cassé qui remplace le sable grossier. La surface filtrante est divisée en cinq parties d'égale surface formant autant de filtres indépendants ; quatre fonctionnent pendant que le cinquième se repose ; la période de travail est donc quatre fois plus longue que la période de repos, laquelle revient pour chacun des filtres à tour de rôle.

Ces bassins filtrants se remplissent ou se vident par un système de vannes commandées par la hauteur d'eau qu'ils retiennent. Le fonctionnement est donc automatique ; chaque filtre met 6 heures pour se remplir ; le remplissage se fait par déversement en nappe mince par-dessus les bords d'une rigole placée à la surface du filtre. Grâce à ce dispositif, l'eau qui sort privée d'oxygène du réservoir clos s'aère rapidement par un large contact avec l'atmosphère, augmenté encore par l'état de division provoqué par le déversement à travers la couche

de mûchefer. Quand le filtre est plein, le jeu des vannes supprime la communication avec le réservoir clos en même temps qu'il le rétablit avec un deuxième filtre; le premier reste plein pendant 6 heures et se vide rapidement. Chaque filtre fonctionne donc environ 12 heures et demie sur 24, savoir : 6 heures de remplissage, 6 heures de plein, et une demi-heure de vidange; le reste du temps, il demeure vide.

Les eaux épuisées peuvent être déversées directement dans un cours d'eau ou utilisées par l'agriculture pour les irrigations.

Pour suivre les progrès de l'épuration dans les deux parties de l'appareil (réservoir clos et bassins filtrants), j'emprunterai les renseignements chimiques au rapport de M. Rideal sur l'installation d'Exeter, destinée à traiter les eaux d'égout d'un quartier de la ville peuplé de 2,000 habitants. Je mettrai également à contribution le rapport de M. G. Sims Woodhead, qui s'est occupé de la partie bactériologique de la question.

Le réservoir clos ne se borne pas à provoquer la sédimentation des matières organiques en suspension dans les eaux; il est le siège d'un travail biologique très actif, accompli par les espèces microbiennes qui le peuplent; la vie aérobie et la vie anaérobie y sont possibles; mais il est évident que c'est celle-ci qui prédomine; la première n'est possible qu'au débouché de la conduite d'arrivée; elle est alimentée par l'oxygène dissous dans les eaux à l'entrée; ce sont donc les ferments anaérobies qui sont les agents de dégradation de la matière organique dans le réservoir clos.

L'analyse chimique permet de mettre en évidence les modifications apportées dans la composition des eaux pendant 24 heures environ de stationnement dans le réservoir. Voici les chiffres obtenus par M. Rideal avec des échantillons pris à l'entrée et à la sortie; ceux-ci étant prélevés 24 heures après les premiers de façon à opérer autant que possible sur la même eau. Les chiffres sont calculés pour 100,000 parties d'eau.

	Extrait.	Oxy- dabilité.	Am. libre.	Am.albu- minoïde.	Nitrites.	Azote des Nitrates	Azote total.	Azote orga- nique.
Eaux d'égout à l'en- trée du réservoir..	46,8	6,56	3,6	1,40	0	0	7,3	4,4
Eaux d'égout à la sor- tie, prises 24 heures après	48,6	4,32	4,9	0,64	Traces.	0,04	6,27	2,2

Il y a donc plus d'extrait à la sortie qu'à l'entrée; cela prouve que les diastases microbiennes ont dissous une certaine quantité de matières solides. D'une manière générale, on voit que la matière organique se dégrade peu à peu dans le réservoir et prend une forme

plus simple; la preuve en est donnée par l'augmentation de l'ammoniaque, la diminution de la matière albuminoïde et par l'oxydabilité moins grande de l'eau.

Ce travail accompli, l'épuration n'en sera que plus rapide et plus complète dans le filtre. Mais ce n'est là qu'un des côtés et assurément le moins intéressant du rôle du réservoir clos. Si son action se bornait à ces modifications, l'appareil d'Exeter ne constituerait pas une amélioration sensible sur le filtre de M. Hiram Mills, car les dégradations mises en évidence par les chiffres précédents s'accompliraient aussi bien, et peut-être plus aisément dans des couches filtrantes activement aérées.

Ce qui nous intéresse surtout, c'est le sort réservé au dépôt de matières cellulosiques qui se forme au fond du réservoir.

Si ces substances sont soumises à une fermentation microbienne, on doit pouvoir retrouver les produits de dislocation, soit à l'état gazeux dans l'atmosphère du réservoir, soit à l'état dissous dans les eaux. De ces derniers, on ne nous parle pas. M. Rideal nous signale, parmi les premiers, l'acide carbonique, le formène ou méthane, et l'hydrogène. Les prises de gaz effectuées un peu au-dessous du niveau du liquide et dans la conduite qui part du réservoir ont fourni des mélanges de la composition suivante :

Acide carbonique.....	0,6	0,3
Méthane.....	24,4	20,3
Hydrogène.....	36,4	18,2
Azote par différence	36,8	61,2
	100,0	100,0

Remarquons que la teneur du mélange en acide carbonique est relativement très faible; par contre il est riche en hydrogène et en formène; les gaz mis en liberté dans le réservoir septique sont donc inflammables et susceptibles d'être brûlés à la sortie de l'appareil, de sorte que les fermentations anaérobies qui se produisent dans le réservoir clos ne peuvent pas répandre au dehors d'odeurs désagréables.

Les chiffres précédents méritent une interprétation plus détaillée, mais auparavant il est bon de rappeler ce que l'on sait de précis sur les fermentations des matières cellulosiques. C'est une question sur laquelle la littérature est pauvre de détails. Les recherches les plus fructueuses ont été faites par M. Gayon en 1882 et 83. (*C. R.*, t. 98, p. 528, et *Soc. nat. d'agric.*, 27 juin 1883). M. Gayon a étudié la fermentation forménique du fumier; il remplissait des bonbonnes avec du fumier et de l'eau et au bout de quelques jours il observait un abondant dégagement de gaz inflammable qu'il faisait brûler pendant

toute la durée de l'expérience à l'orifice d'un tube effilé. Ce gaz combustible était constitué par du formène; l'hydrogène était absent. M. Gayon a pu obtenir, avec 1 mètre cube de fumier et d'eau, 100 litres de formène par 24 heures à la température de 35°. C'est une fermentation active comme on le voit. Elle est produite par un bacille fin, qui peut être isolé et cultivé à l'état de pureté dans un liquide nutritif renfermant de la paille ou du papier; il décompose, en culture pure, la cellulose du papier avec dégagement de formène et d'acide carbonique.

Vers la même époque M. Dehérain¹ constatait que les gaz du fumier sont constitués presque exclusivement par du formène, dans certaines parties seulement du tas en fermentation; mais il n'a pas trouvé d'hydrogène; M. Reiset avait d'ailleurs déjà signalé le formène dans les fumiers en fermentation.

M. Hoppe-Seyler² obtint aussi du formène impur en faisant fermenter du papier de Suède dans un liquide nutritif avec des microbes pris dans la vase du cours d'eau.

Cependant, tout récemment M. Omeliansky³ a mis en évidence une fermentation de la cellulose du papier qui ne donne que de l'hydrogène et de l'acide carbonique, mais cette fermentation est très lente, de même que celle qui a été observée par M. Hoppe-Seyler; elles durent des mois et même des années avec quelques grammes seulement de cellulose.

A côté de ces ferments de la cellulose vraie, c'est-à-dire de celle qui forme les fibres du lin ou le papier de Suède, il faut signaler toute une classe de microbes, les ferments butyriques, capables de décomposer les hydrates de carbone qui se rapprochent de la cellulose vraie par leur composition et par leur dissémination de la nature; ils se développent également à l'abri de l'air, en produisant de l'hydrogène, de l'acide carbonique, des acides volatils et des alcools primaires⁴.

De ce court aperçu on peut tirer les conclusions suivantes :

Une fermentation forménique pure ne donne pas naissance au gaz hydrogène; si donc on constate la présence de ce dernier, on doit en déduire qu'on a affaire à une fermentation du genre de celle qui a été signalée par M. Omeliansky, ou bien à une ou plusieurs fermentations butyriques.

La présence de l'hydrogène nous autorise en outre à affirmer qu'il y a une production abondante d'acides volatils, tels que les acides formique, acétique, butyrique, qui restent dans le liquide et qui ont par

1. *C. R.*, t. 98, p. 377.

2. *Zeit. für phys. Chemie* X, 1886.

3. *Arch. des Sciences biol. de St-Petersb.*, t. VII, p. 441.

4. Van Tieghem, *Bulletin de la Soc. Bot. de Fr.*, 1877 et 79.

conséquent une grande influence sur la réaction du milieu et la nature des fermentations qui s'y produisent.

Enfin, une troisième remarque : M. Omeliansky, qui a essayé de reproduire la fermentation observée par M. Hoppe-Seyler, n'y est pas parvenu; il a obtenu celle que je viens de rappeler, cela veut dire que tous ces microbes capables de détruire la cellulose sont très sensibles à des influences qui nous échappent, de sorte qu'il est jusqu'ici impossible de reproduire à volonté telle ou telle fermentation de la cellulose.

Si maintenant on examine à la lumière de ces résultats les chiffres fournis par M. Rideal, on peut dire que le réservoir clos est le siège de plusieurs modes de fermentation des matières hydrocarbonées insolubles, et en particulier de la cellulose; puisqu'il y a production d'hydrogène, il y a aussi formation de quantités relativement grandes d'acides volatils (dans les expériences de M. Omeliansky ils représentaient 70 0/0 de la cellulose détruite). La réaction du milieu varie donc d'un point à un autre dans le réservoir, ce qui veut dire que les conditions faites aux microbes sont très instables, et ce ne sont pas celles qui y sont réalisées qui favorisent la fermentation forménique, puisque, suivant l'observation de M. Schlöesing¹, celle-ci prend dans ces conditions le pas sur les autres.

La réaction variera aussi avec la nature des eaux; elle ne sera pas la même avec une eau fortement calcaire par exemple et une eau qui provient de terrains primitifs complètement dépourvue de chaux; c'est encore un point à considérer.

On se demande donc dans quelle mesure le réservoir clos accomplit cette partie si importante de l'épuration des eaux d'égout; on voit par ce qui précède qu'il est impossible de se prononcer, d'après les chiffres que nous fournit le rapport de M. Rideal. Il faut une étude bactériologique détaillée de tous les ferments de la cellulose qui peuvent se rencontrer dans le réservoir, ou bien des chiffres qui nous donnent la quantité de cellulose détruite dans un temps donné et la quantité reçue par le réservoir dans le même temps.

La seule allusion à ce dernier point se trouve dans la remarque suivante de M. G. Sims Woodhead : « Nous savions que les couches de boue du fond du réservoir paraissent s'accroître très peu en épaisseur, et nos propres expériences confirment ce fait, car l'augmentation du dépôt après plusieurs mois de fonctionnement était effectivement très faible. »

Pour permettre au lecteur de se former une opinion, il faut des nombres et non des évaluations approximatives : la question d'ailleurs présente assez d'intérêt pour être résolue méthodiquement.

La seconde partie de l'appareil doit accomplir un travail plus facile

¹ *C. R.*, 1889, t. 109, p. 835.

à concevoir; en un mot, elle doit transformer tout l'azote organique et ammoniacal en nitrates. Tout y est d'ailleurs ménagé, comme je l'ai dit, pour activer au maximum les phénomènes de combustion que les microbes sont capables de produire. On sait que les milieux alcalins sont particulièrement favorables à ce genre de fermentations, et cette remarque nous conduit encore à faire observer que les eaux sortant du réservoir clos ne doivent pas toujours remplir cette condition; si par exemple elles sont acides, le mâchefer ne leur cédera pas assez de composés basiques pour neutraliser leur acidité, et alors les phénomènes d'oxydation se feront moins bien et moins vite; en particulier la transformation de l'ammoniaque en nitrate sera plus difficile, parce que cette transformation sera accompagnée d'une augmentation rapide du taux d'acidité. On doit donc retrouver dans les eaux filtrées plus d'azote ammoniacal que d'azote nitrique.

Dans les filtres ordinaires, dans les sols siliceux utilisés pour l'épandage, la réaction de la matière filtrante n'a pas d'importance, parce que les eaux d'égout, en général ammoniacales, ne deviennent acides que lorsque l'épuration est terminée; et alors les eaux entraînent avec elles les substances qui pourraient gêner le travail ultérieur des filtres; dans le procédé d'Exeter cet inconvénient se fait sentir dès le début de la combustion dans les filtres, à cause du long séjour que les eaux font dans le réservoir clos.

Le tableau suivant emprunté à M. Rideal résume la marche de l'épuration dans tout l'appareil; les analyses portent sur deux séries d'échantillons pris à l'entrée et à la sortie du réservoir clos, et à la sortie des filtres, afin de bien montrer le rôle de chacune des deux parties de l'installation :

	Extraits.	Oxy- dabilité.	Am. libre.	Am. albu- minoïde.	Nitrites.	Azote des nitrates.	Azote total.	Azote orga- nique.
<i>1^{re} série.</i>								
Eaux d'égout à l'en- trée du réservoir ..	46,8	6,56	3,6	1,40	0	0	7,4	4,4
A la sortie du résér- voir.....	48,6	4,32	4,9	0,64	Traces.	0,041	6,24	2,2
Après la filtration...	42,4	0,78	2,48	0,45	Traces.	0,30	4,5	2,2
<i>2^e série.</i>								
Eaux à l'entrée du ré- servoir.....	55,	3,61	8,05	4,03	Traces.	0,02	12,82	5,8
A la sortie du résér- voir.....	59,0	2,73	11,2	2,66	Traces.	0,022	14,92	5,7
Après la filtration....	49,9	1,13	6,05	0,87	Sensible.	1,06	10,46	4,4

Ces chiffres montrent que les eaux renferment encore une trop forte proportion d'azote organique et d'azote ammoniacal; elles sont en somme relativement pauvres en nitrates; il y a beaucoup plus d'azote à l'état d'ammoniaque qu'à l'état de nitrates; c'est le contraire

que l'on devrait observer; ces résultats confirment donc ce que j'ai dit sur le rôle de l'acidité développée dans le réservoir septique; mais il ne faudrait pas cependant les attribuer exclusivement à cette cause; ils sont dus peut-être aussi, en partie du moins, au mode de fonctionnement imposé aux filtres. Il est à peu près certain que les phénomènes d'oxydation sont complètement arrêtés dans la masse du filtre durant les six heures pendant lesquelles il reste plein. L'oxygène dissous pénètre à peine sur une profondeur de quelques centimètres dans un milieu aussi peuplé de bactéries aérobies, de sorte que les fermentations anaérobies réapparaissent rapidement au sein de l'eau.

L'oxydabilité a baissé beaucoup pendant la filtration; cela prouve que la matière organique qui reste absorbe peu d'oxygène; l'ammoniaque restante peut en outre être déversée, sans inconvénient, dans un cours d'eau parce qu'elle se transforme rapidement en nitrate; mais la conclusion qui se dégage de ces chiffres est que l'épuration n'est pas assez avancée au moment où les eaux quittent le filtre.

L'étude chimique que je viens de résumer a été complétée par une étude biologique des ferments qui peuplent le réservoir clos et les filtres. Des recherches bactériologiques bien dirigées pourraient nous renseigner sur la nature des fermentations qui se produisent dans le réservoir clos; ces fermentations ne sont pas encore très bien connues, comme j'ai eu déjà l'occasion de le faire observer.

M. Sims Woodhead n'a pas abordé la question sous ce point de vue. Il s'est attaché à faire des numérations de microbes, à caractériser les espèces prédominantes qu'il a pu isoler et à les étudier dans leurs rapports avec la dégradation des matières azotées, en prenant comme terme de comparaison la liquéfaction de la gélatine.

La plupart des espèces microbiennes obtenues par des isolements faits sur plaques de gélatine possèdent, d'après M. Woodhead, la propriété de nitrifier l'azote ammoniacal dans l'eau recueillie à la sortie du réservoir clos et stérilisée par filtration à travers une bougie Chamberland. Il y a là, évidemment, une faute de manipulation, ou une erreur d'observation manifeste. Les ferments nitrifiants sont aujourd'hui parfaitement connus par les travaux de Winogradsky¹; il est absolument impossible de les isoler par le procédé employé par M. Woodhead; on sait également, d'après les recherches de M. Ome-liansky², que l'azote ammoniacal, à l'exclusion des amines et des amides, est seul susceptible d'être oxydé par les ferments nitrifiants.

L'auteur a tiré un meilleur parti des numérations qu'il a faites. On sait en effet que M. Hiram Mills a mis en évidence ce fait que plus les microbes nitrifiants prennent possession du milieu, plus grande est la

1. Ces *Annales*, 1890 et 1893.

2. *Archives des sciences biol.*, t. VII, p. 273.

pureté de l'eau au point de vue du nombre de microbes banaux qu'elle renferme. En d'autres termes, le nombre de microbes cultivables, présents dans les eaux d'égout, diminue rapidement avec les progrès de la gazéification et de la minéralisation de la matière organique. Ce fait n'est pas spécial aux filtres artificiels ; on l'a également vérifié dans l'épuration naturelle par le sol et par les fleuves. Ainsi, par exemple, l'eau de la Seine renfermait, en 1895, 78,000 bactéries par c. c. à son entrée dans Paris, 159,000 au centre de la ville, 2,813,000 après le débouché du collecteur de Clichy, puis à Meulan où l'épuration est déjà complète 275,000, et, enfin, 272,000, un peu plus en aval, à Mantes¹.

Les chiffres obtenus par M. Woodhead n'accusent pas cette décroissance. Les eaux d'égout renferment de 3 à 5 millions de bactéries par c. c. à leur entrée dans le réservoir septique, 1 million à leur sortie du réservoir, et de nouveau 3 à 5 millions à la fin de la filtration, en ne tenant compte que des espèces aérobies. La conclusion qui découle de ces chiffres est identique à celle qui a été fournie par l'analyse chimique : ils témoignent d'une manière irrévocable que l'épuration n'est pas complète au moment où l'on évacue les eaux des filtres.

Une eau aussi riche en microbes doit être plus ou moins opalescente ; c'est justement la remarque que fait M. Rideal sur la plupart des échantillons qu'il a observés. Ces échantillons étaient incolores et sans odeur, mais présentaient souvent une légère opalescence qui a disparu au bout de quelques jours sans donner de dépôt visible.

Ce louche était dû très probablement aux bactéries en suspension ; le liquide a repris la limpidité à la suite de la dissolution des corps microbiens sous l'influence des diastases qu'ils avaient abandonnées à l'eau. C'est un exemple d'autophagie assez commun dans le monde des microbes.

En résumé, l'appareil d'épuration des eaux d'égout exposé au Palais du Génie civil semble reposer sur des principes théoriques qui sont en parfait accord avec les notions que la science a conquises dans le domaine des transformations biologiques produites par les microbes. Malheureusement il y a loin de la théorie à l'application pratique. Ce procédé réclame encore une étude minutieuse dont j'ai signalé quelques points en passant ; les résultats qu'il fournit dans les conditions actuelles de son fonctionnement laissent encore place à des améliorations.

1. DUCLAUX. *Traité de chimie biol.*, t. I., Paris 1898. Masson.

P. MAZÉ.